



**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Tesis Doctoral**

---

Relación entre los niveles séricos del factor de crecimiento endotelial-vascular C (VEGF-C) y la afectación ganglionar axilar en pacientes con Cáncer de Mama operable sometidas a biopsia selectiva del ganglio centinela.

Doctorando

**D. José Claudio Maañón**

Directores

**Dr. Emilio Alba Conejo**

**Dr. Antonio Rueda Domínguez**

Málaga 2019



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: José Claudio Maañón



<https://orcid.org/0000-0001-7761-0518>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización  
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## Facultad de Medicina

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA  
Departamento de Medicina y Dermatología

**D. EMILIO ALBA CONEJO**, Catedrático de Oncología del Departamento de Medicina y Dermatología de la Universidad de Málaga y **D. ANTONIO RUEDA DOMÍNGUEZ**, Tutor Clínico del Departamento de Medicina y Dermatología de la Universidad de Málaga.

### **CERTIFICAN**

Que el trabajo de investigación presentado como Tesis Doctoral por D. José Claudio Maañón titulado: "Relación entre los niveles séricos del factor de crecimiento endotelial-vascular C (VEGF-C) y la afectación ganglionar axilar en pacientes con Cáncer de Mama operable sometidas a biopsia selectiva del ganglio centinela", ha sido realizado bajo su dirección y consideran que reúne las condiciones apropiadas en cuanto a contenido y rigor científico para ser presentado a trámite de lectura.

Y para que conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes expiden y firman el presente certificado en Málaga, el 8 de octubre de 2018.

Fdo.: Dr. Emilio Alba Conejo  
Tutor de Tesis

Fdo.: Dr. Antonio Rueda Domínguez  
Director de Tesis

## **Agradecimientos**

*A Laura, Florencia y Manuel; sin los cuales nada tendría sentido.*

*A mis Tutores, a los cuales tuve la fortuna de conocer y así enriquecer mi  
persona y mi profesión.*

*A mis pacientes, permanente ejemplo de vida.*

## ÍNDICE:

1	INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
1.1	La biopsia selectiva del ganglio centinela en cáncer de mama. La hipótesis sobre el cáncer de mama.....	6
1.1.1	La biopsia selectiva del ganglio centinela en cáncer de mama.....	8
1.1.2	Manejo de la axila en el cáncer de mama.....	11
1.1.2.1	Exactitud de la BSGC en CM clínicamente T1-3 N0.....	11
1.1.3	Recurrencias loco regionales en los ganglios axilares.....	13
1.1.3.1	Disección axilar versus ningún tratamiento.....	13
1.1.3.2	Disección axilar completa versus radioterapia.....	15
1.1.3.3	Disección axilar completa vs BSGC.....	16
1.1.3.4	BSGC sola en GC positivo.....	18
1.1.3.5	Resultados adversos relacionados con la cirugía axilar.....	21
1.2	El rol de la linfangiogénesis en cancer.....	22
1.2.1	Los factores linfangiogénicos VEGF-C/D y el receptor VEGFR-3.....	24
1.2.2	Significado pronóstico del factor VEGF-C tisular.....	26
1.2.3	Factor VEGF-C , linfangiogénesis y presencia de metástasis en el ganglio centinela en cáncer de mama.....	28
1.2.4	Niveles séricos del VEGF-C como factor pronóstico.....	36
2	OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	40
2.1	Objetivos.....	40
2.1.1	Objetivos primarios:.....	40
2.1.2	Objetivos secundarios:.....	40
2.2	Hipótesis.....	41
3	METODOLOGÍA.....	42
3.1	Diseño.....	42
3.2	Selección y retirada de los sujetos.....	43
3.2.1	Criterios de inclusión.....	43
3.2.2	Criterios de exclusión.....	43
3.2.3	Criterios de retirada de un sujeto.....	44
3.2.4	Criterios previstos para la retirada de los sujetos del estudio.....	44
3.3	Determinación del tamaño muestral.....	44
3.4	Protocolo del estudio.....	44
3.4.1	Descripción de los procedimientos del estudio.....	45
3.4.1.1	Toma de muestra de sangre.....	45
3.4.1.2	Técnica del mapeo linfático.....	45
3.4.1.3	Técnica de la Biopsia (Giuliano) y vaciamiento axilar posterior.....	46

3.4.1.4	Definición de Ganglio Centinela y de Falso Negativo.....	47
3.4.1.5	Estudio intra operatorio.....	47
3.4.1.6	Determinación de los niveles de VEGF-C en suero .....	49
3.4.1.7	Determinación de otras variables.....	49
3.5	Variables a estudio .....	50
3.1.1.	Variable principal .....	50
3.1.2.	Variables secundarias .....	50
3.1.2.1.	Variables clínicas.....	50
3.1.2.2.	Variables analíticas .....	50
3.6	Recogida y análisis de los datos.....	50
3.7	Tabla cronológica del estudio .....	51
3.8	Procedimientos por visitas .....	52
3.8.1	Visita de selección (prequirúrgico) .....	52
3.9	Limitaciones del estudio.....	53
3.10	Cronograma (tabla 3.II.).....	54
3.11	Valoración de la eficacia .....	56
3.11.1	Determinaciones de laboratorio .....	56
3.12	Evaluaciones de seguridad.....	56
3.13	Exploración física, constantes vitales.....	56
3.14	Otras pruebas complementarias .....	57
3.15	Incidencia de acontecimientos adversos.....	57
3.15.1	Ética .....	57
3.15.2	Comité Ético (CEI local) y Autoridades .....	57
3.15.3	Consentimiento informado .....	57
3.15.4	Confidencialidad .....	58
4	RESULTADOS .....	59
4.1	Análisis descriptivo .....	59
4.2	Análisis bivariado / multivariable .....	61
4.3	Análisis de la supervivencia.....	62
4.4	Análisis por subtipos intrínsecos.....	68
5	DISCUSIÓN.....	71
6	CONCLUSIONES .....	80
7	Anexo I. ....	81
8	Anexo II .....	83
9	BIBLIOGRAFÍA.....	85

# 1 INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 La biopsia selectiva del ganglio centinela en cáncer de mama. La hipótesis sobre el cáncer de mama

Hace casi 50 años se publicaron los primeros resultados científicos que justificaron reemplazar la hipótesis de enfermedad originada por Halsted por una nueva hipótesis que no solo sustentaba los estudios realizados por Fischer, sino que los mismos eran prueba de su veracidad(1).

La aceptación de la mastectomía radical se debió tanto a la efectividad de la misma como a lo atractivo del modelo de enfermedad que describió Halsted (2). La premisa que sustentaba este modelo es aquella que considera al cáncer de mama como una enfermedad ordenada, que progresa por contigüidad desde el sitio primario, mediante extensión directa, hacia los ganglios linfáticos, y luego hacia sitios metastásicos distantes. Esto implica que un efectivo tratamiento debe reconocer este ordenado patrón de progresión. Este atractivo modelo derivó en un tipo de cirugía llamada “en bloque”. A pesar de un estancamiento en la efectividad de la mastectomía radical, no fue sino hasta el año 1975 cuando una nueva hipótesis alternativa fue aceptada.

Esta nueva hipótesis, propuesta por Fisher, sugiere que el cáncer de mama es una enfermedad sistémica. El compromiso linfoganglionar no es producto de una diseminación ordenada de la enfermedad, sino un marcador de la presencia de enfermedad a distancia. De acuerdo a esta nueva teoría, las diferentes alternativas en el control local no están relacionadas con la obtención de una mejor supervivencia.

La idea de que podemos obtener una nueva hipótesis o paradigma de enfermedad mezclando ambas hipótesis es poco probable. La hipótesis de Halsted estaba basada en el empirismo y la de hipótesis de Fischer en estudios de investigación, y respaldada por una serie de estudios aleatorizados.

Sin embargo, algunos autores como Rabinovitch y Kavanagh (3), creen que podría existir una tercera alternativa, basada en la falta de reconocimiento por parte de la teoría de Fischer (enfermedad sistémica) de la importancia de la recurrencia local regional.

Sin embargo es posible que la indicación de una cirugía o la utilización de radioterapia (RT) en forma impropia (4), junto con inadecuados sistemas de diagnóstico, hayan sido la causa de las dudas sobre la credibilidad de la cirugía conservadora de la mama en el pasado y posiblemente ahora también de los tratamientos destinados a evitar la linfadenectomía axilar el cáncer de mama.

Si bien las recidivas locales mamarias (recidivas ipsilaterales) luego de una cirugía conservadora son un poderoso factor de riesgo para recidiva a distancia, no es posible asegurar que no sean una potencial fuente de nuevas metástasis(5).

Como consecuencia del uso de RT complementaria en las pacientes del estudio NSABP B-06 sometidas a cirugía conservadora de la mama, se obtuvo una disminución del 7,2% en la mortalidad específica, asociada a una notable disminución de las recidivas ipsilaterales en la mama (24%). Es posible entonces que no sea la cirugía conservadora del cáncer de mama sino las variaciones en el tratamiento loco regional las que afecten sustancialmente la sobrevida (6, 7).

Actualmente, y basados en una extensa evidencia experimental, el cáncer de mama es considerado una enfermedad sistémica. Esta hipótesis sistémica es binaria: las metástasis pueden o no existir. Si están presentes, aun en forma microscópica, están extensamente diseminadas. Una interpretación errónea de esta hipótesis puede inducir a pensar que el control local de la enfermedad no tiene importancia ni impacto alguno en la sobrevida.

El sistema de estadificación mayormente usado en cáncer de mama se basa casi exclusivamente en factores anatómicos, y está definido por “Tumor – Ganglios – Metastasis” (Tumor – Node- Metastasis, TNM). El American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Union for International Cancer Control (UICC) desarrollaron el sistema TNM en 1978 el cual ha sido periódicamente actualizado desde entonces, siendo la séptima edición la última publicada (2010) . Hay que destacar al menos dos peculiaridades de esta última edición: la definición de casos T1N1mic como estadios IB y la ausencia de consideración de los subtipos tumorales biológicos, a pesar de la abundante evidencia de su importancia (8).

Los análisis de la expresión genética han resultado en el reconocimiento de diferentes subtipos de cáncer de mama (CM). Dado que no siempre es posible obtener información genética de la expresión genómica, se ha desarrollado una clasificación simple que define los diferentes subtipos mediante parámetros clínico patológicos , similares pero no idénticos a los subtipos intrínsecos , aunque representan una conveniente aproximación.

Los tumores clasificados como Luminal A expresan receptores para estrógenos y progesterona, son HER 2 neu negativos y presentan un bajo índice de duplicación celular (Ki 67 <14%). Los tumores Luminal B (Her 2 neu negativos) tienen las mismas características que los anteriores, aunque presentan un KI 67 alto. Existe un segundo



subtipo de tumores Liminales B (HER 2 neu positivos) que expresan receptores tanto para estrógeno como para progesterona, e independientemente del grado de duplicación celular (Ki 67), también expresan o amplifican el HER 2 neu. El siguiente subtipo corresponde a los tumores que sobre expresan el HER 2 neu pero no son luminales, es decir no expresan receptores hormonales. Y finalmente un subtipo que no expresa ni receptores hormonales ni HER 2 neu , comúnmente llamado triple negativo (ductal) o basal like.

Ya no es posible considerar al CM como una enfermedad única (9). Cada subtipo tiene diferentes factores epidemiológicos, diferentes historias naturales y diferentes respuestas al tratamiento local y sistémico. De todas formas, aun hoy existe considerable controversia sobre la habilidad que tienen los métodos moleculares para asignar correctamente el subtipo molecular a una muestra específica. Es posible que los subtipos moleculares no estén definidos en forma sólida, y la misma definición de subtipos de Sorlie et al cambia a medida que pasa el tiempo hacia la clasificación basada en la plataforma de expresión génica PAM 50 usada actualmente (10).

En las pacientes con cáncer de mama, la estadificación axilar ha sido tradicionalmente una parte integral del manejo terapeutico, y el compromiso ganglionar ha sido considerado un importante factor pronóstico y de selección del tratamiento. El CM es actualmente diagnosticado en fase cada vez más temprana, y la extensión del compromiso axilar ha disminuido notablemente. En pacientes con ganglios clínicamente negativos, el Ganglio Centinela(GC) es el único comprometido en el 40% al 60% de los casos.

Luego de años de cirugía axilar radical, el manejo actual favorece a un tratamiento menos agresivo como la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC). Este procedimiento continúa aportando la información diagnóstica y pronostica necesaria, limitando la morbilidad y mejorando la calidad de vida de las pacientes (11-13).

### **1.1.1 La biopsia selectiva del ganglio centinela en cáncer de mama.**

En España se diagnostican anualmente cerca de algo más de 25.200 casos de cáncer de mama al año. En los últimos 20 años, el tamaño medio de los tumores mamarios ha disminuido un 10% cada 5 años, siendo actualmente de unos 1,8 cm.

De esta forma más del 60% de las pacientes tienen la opción de recibir un tratamiento conservador de la mama (CC), el cual requiere de la exéresis tumoral con un margen libre de neoplasia y la adición de radioterapia complementaria.

El tratamiento conservador de la mama está basado en la evidencia científica derivada de estudios randomizados, y provee equivalentes tasas de supervivencia global (SG) que la que ofrece la mastectomía radical (14, 15). Debido a la efectiva detección precoz del cáncer de mama y de la evolución de las terapias complementarias o adyuvantes, la supervivencia del cáncer de mama a 5 años es hoy cercana al 90%.

La evolución hacia cirugías más conservadoras para el tratamiento local del CM tiene un segundo componente en la cirugía de los ganglios axilares. La cirugía radical o completa de los ganglios axilares fue introducida en el 1800, tanto como estadificación como para alcanzar el control loco - regional de la enfermedad (16). La disección completa de los ganglios axilares requiere la remoción de todo el tejido comprendido entre determinados límites anatómicos (figura 1.1.): superiormente la vena axilar, lateralmente el paquete vasculo nervioso del dorsal ancho, y medialmente el nervio de Charles Bell (o del músculo serrato mayor). Estos límites se refieren al nivel I y II de disección axilar donde habitualmente se extraen entre 10 a 40 ganglios linfáticos.

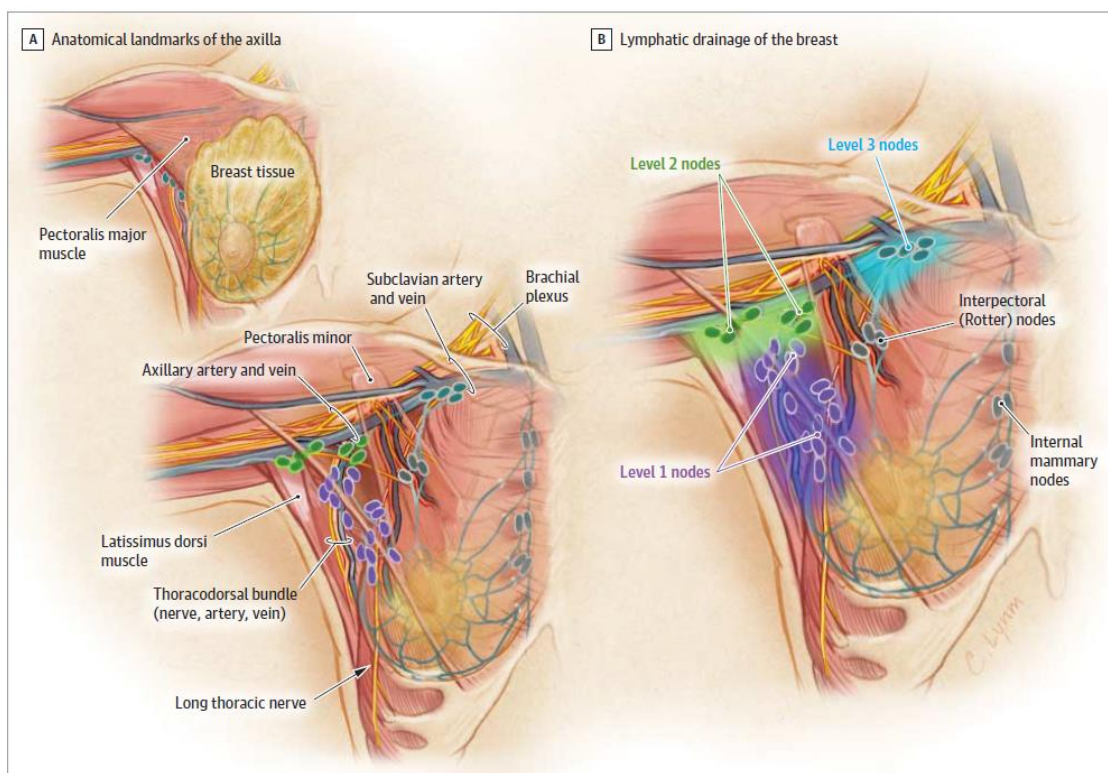


Figura 1.1. Límites anatómicos de la axila.

Este nivel de disección axilar está asociado a un aumento del riesgo de complicaciones o resultados adversos como linfedema del miembro superior (14%), limitación de la movilidad del hombro (28%) o dolor neuropático (31%)(17).

Con la mejora en los programas de detección precoz del CM, actualmente muchos pacientes no tienen evidencia clínica o ecográfica de compromiso ganglionar axilar. La primera descripción de la aplicación de la técnica de biopsia selectiva del ganglio centinela en CM fue hecha en 1994 (18). Para la localización del ganglio centinela se han utilizado, tanto tecnecio 99 como azul de isosulfán (o azul de metileno) mediante inyección en la mama o bajo la piel de la misma. Para la biopsia selectiva de ganglio centinela es necesario contar con algún sistema fiable de detección durante el acto operatorio que nos permita distinguirlo del resto de los ganglios regionales y que facilite su biopsia selectiva(19, 20).

El concepto de mapeo linfático y de la biopsia del ganglio centinela fue popularizado por Morton et al. en pacientes con melanoma (21). El ganglio centinela es el primer ganglio linfático al que drena un cierto tumor (22). Morton demostró que la inyección intradérmica de un colorante azul vital alrededor del melanoma permitió la identificación del ganglio centinela en la mayoría de los pacientes, y que el “status” del mismo podía predecir el compromiso de los demás ganglios regionales. La técnica fue descrita para el cáncer de mama por Giuliano en 1994, basándose en el uso de un colorante vital en forma peritumoral preoperatoria (18).

La eficacia técnica de la prueba diagnóstica inicial de la biopsia del Ganglio centinela con el uso de estos colorantes vitales (23) (en su experiencia primaria el ganglio centinela se identificó en el 65,5 % de los casos y su nivel de certeza fue del 95.6% en predecir el estado de los restantes ganglios axilares)(24), fue posteriormente mejorada en forma significativa, mediante el uso y la introducción de los trazadores radioisotópicos (coloides marcados con Tc-99m sulfurado) (25-29) y el uso en forma intraoperatoria de sondas portátiles detectoras de radiaciones gamma.

Así los primeros ganglios (en general de 1 a 4) que expresan radioactividad o captan el colorante inyectado son extraídos y analizados en busca de metástasis, bajo la presunción de que son los primeros en ser afectados por la diseminación metastásica. En caso de no afectación del ganglio centinela la posibilidad de afectación de otros ganglios axilares no centinelas (NoGC) es menor del 10% (siendo

estándar un porcentaje de falsos negativos del 5%), obviando la necesidad de mayor tratamiento quirúrgico en la axila.(11, 30)

Por lo tanto, el marco teórico del presente trabajo requiere de una revisión de los riesgos y beneficios de la BSGC en comparación tanto con el vaciamiento axilar radical clásico (VAX) como con intervenciones no quirúrgicas (ejemplo: radioterapia axilar) en pacientes con CM sin evidencia clínica de compromiso axilar.

Esta comparación debe basarse en la evaluación de resultados finales como tasa de recurrencia axilar, mortalidad y morbilidad asociada con cada una de las intervenciones sometidas a comparación.

### **1.1.2 Manejo de la axila en el cáncer de mama**

Los objetivos de la cirugía axilar en CM son: 1) la estadificación certera de la enfermedad con la intención de guiar las decisiones terapéuticas y obtener información pronóstica, 2) maximizar la sobrevida y el control local de la paciente.

#### **1.1.2.1 Exactitud de la BSGC en CM clínicamente T1-3 N0**

Al menos 25 estudios han sido publicados en forma completa sobre la exactitud diagnóstica de la BSGC en pacientes con CM cT1-3 N0 (31). La evaluación inicial de la BSGC se centró en los resultados relacionados con la tasa de falsos negativos (FN), sin embargo, los principios de medicina basada en la evidencia dictan el uso de las razones de probabilidad para valorar la exactitud diagnóstica del procedimiento. Este análisis permite una interpretación individualizada de los resultados, usando la razón de probabilidad de un resultado positivo (LR+) o la razón de probabilidad de un resultado negativo (LR-)

Así los resultados combinados de 19 estudios mostraron una tasa de FN del 8,5% (paciente incorrectamente etiquetados como N0 por el procedimiento BSGC). Sin embargo, la razón de probabilidad pre test es diferente para un cT1 que para un cT3. La razón de probabilidad negativa al utilizar la BSGC es del 0,7% en cT1a, 1,5% en cT1b, 3% en cT1c, 7% en cT2 y 18% en cT3 (figura 1.2.)

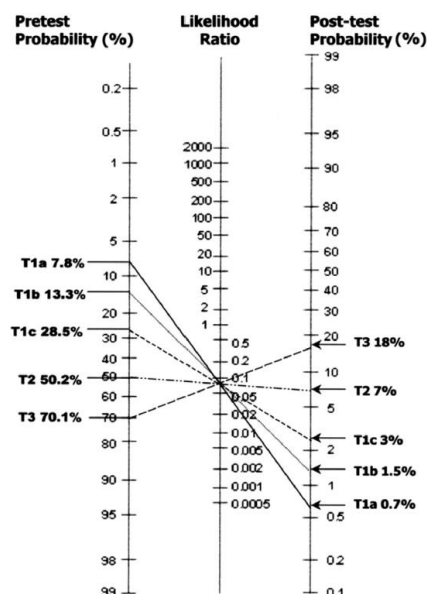


Figura 1.2. Probabilidad de un ganglio no centinela positivo luego de un GC negativo usando razones de probabilidad calculados en base a los datos del estudio NSABP B-32.

El estudio más extenso publicado es el NSABP B-32, con 2672 pacientes, de los cuales solo 55 eran T3 (2,1%) (32). En este estudio pacientes con CM y clínicamente N0 fueron aleatorizadas a BSGC seguida de linfadenectomía axilar (grupo 1), BSGC seguida de linfadenectomía axilar solo en casos de GC positivos y en caso de GC negativo ninguna otra cirugía axilar (grupo 2)

Es interesante comentar que los datos que sostienen que el diámetro tumoral no tiene impacto en el procedimiento BSGC son muy escasos cuando tenemos en cuenta tumores T3. Por ejemplo Hill et al (33) no encontraron relación entre el tamaño tumoral y la tasa de FN de la BSGC (10,6%); sin embargo solo 55 casos de los 500 casos incluidos en el estudio eran T3. Similarmente, Veronesi et al (34) publicaron una tasa de FN del 6,7% pero en su estudio los autores no incluyeron tumores T3. Igualmente, otros autores han publicado datos similares con una baja inclusión de tumores T3 entre sus casos. Estos hallazgos y la implicaciones de usar LR- pueden aclarar la discrepancia entre una reciente revisión sobre el tema hecha por Ho y Morrow (35) y las guías clínicas de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) (36). La revisión de Ho sostiene que la BSGC es certera al ser usada en la estadificación de tumores T1-T3, y por el contrario la guía ASCO no recomienda el uso de la BSGC en tumores T3 y T4.

### 1.1.3 Recurrencias loco regionales en los ganglios axilares

#### 1.1.3.1 Disección axilar versus ningún tratamiento

Como se ha referido anteriormente, la disección axilar completa implica la remoción de al menos los niveles I y II axilares. El riesgo de recurrencia loco regional (RL) con y sin disección axilar depende fundamentalmente del número de ganglios axilares metastásicos y del tamaño de las metástasis en los ganglios axilares (conocida como carga tumoral metastásica) (37, 38), el grado tumoral alto (39, 40) la edad temprana al diagnóstico(41) y la presencia de invasión linfo vascular(39).

La primera evidencia de la posibilidad de adoptar un enfoque multimodal para el tratamiento del cáncer de mama, usando la combinación de cirugía y radioterapia, proviene del estudio National Surgical Adjuvant Bowel and Breast Project (NSABP B-04).(6) En este estudio pacientes con cáncer de mama sin evidencia de adenomegalias palpables o de compromiso axilar fueron aleatorizadas a recibir una mastectomía radical (remoción de la totalidad de la mama, el nivel I y II ganglionar axilar y los músculos pectorales mayor y menor, n = 362) versus solo mastectomía total (resección de solo la mama con preservación de los músculos pectorales y de los ganglio axilares, n = 352) asociada a radioterapia axilar versus mastectomía total sola (n = 365). En los dos grupos que no fueron sometidos a la disección axilar el riesgo desarrollar enfermedad axilar fue del 18,6%. En caso de aparición de metástasis axilares, estas pacientes fueron sometidas a vaciamiento axilar completo. La sobrevida global luego de 25 años de seguimiento no fue significativamente diferente entre los dos grupos ( $p= 0.68$ ). Este estudio fue el primero en sugerir que las pacientes con CM podrían beneficiarse de tratamientos quirúrgicos menos radicales (Tabla 1.1.)

Un análisis posterior del estudio NSABP B-04 exploró los resultados en pacientes con ganglios axilares palpables / sospechosos, los cuales habían sido aleatorizados a recibir una mastectomía radical (n = 292), o mastectomía total con radioterapia y sin disección axilar (n= 294) El riesgo de recaída axilar fue ligeramente superior en el grupo que recibió radioterapia sola sobre la axila (8%,  $p = 0.04$ )

Greco et al (42) en su estudio sobre 410 pacientes sometidas a mastectomía parcial (cuadrantectomía) asociada a irradiación del volumen mamario, también omitieron



cualquier tipo de cirugía axilar. Todos de los tumores tenían un diámetro de 3 cm o menos y el 81% de las pacientes eran post menopáusicas; ninguna de las pacientes tenía evidencia clínica de compromiso axilar. Las recurrencias axilares variaron entre un 1.7 a 10% para los tumores T1, hasta el 18% para los tumores T2. Martelli et al (43) publicaron también un 1.8% de recurrencias axilares en 110 pacientes con CM mayores de 65 años y con tumores T1 sometidas a cirugía conservadora de la mama asociada a tamoxifeno, pero sin ningún tipo de tratamiento quirúrgico sobre la axila.

En general, la disección completa de los ganglios axilares alcanza un control loco regional excelente, con una tasa de recurrencias axilares que varía entre el 0% y el 3.5% en aquellos pacientes sin ganglios axilares palpables sospechosos (11, 43-45).

Tabla 1.I. Estudios sobre disección axilar versus no tratamiento axilar específico

Fuente	Período de estudio	edad	Estado Axilar	Diámetro tumoral	seguimiento	Intervenciones	Muestra	RL Nº (%)	SG % (SE) <sup>a</sup>
Fisher et al(14)	1971-1974	Cualquier edad (70% >50 años)	Ganglios clínicamente palpables / sospechosos	Media 3.7 (DE, 2) cm	Media 20 años	Mastectomía radical	292	22 (8) <sup>b</sup>	11 (2)
						Mastectomía total + RT	294	33 (11) <sup>b</sup>	10 (2)
Fisher et al(14, 42)	1971-1974	Cualquier edad (70% >50 años)	Ganglios clínicamente no palpables o sospechosos	Media 3.7 (DE, 2) cm	Media 20 años	Mastectomía radical	362	15 (4)	19 (2)
						Mastectomía total + RT	352	15 (4)	13 (2)
						Mastectomía total	365	23 (6) <sup>c</sup>	19 (2)
Greco et al(42)	1986-1994	Cualquier edad (85% >50 años)	Ganglios clínicamente no palpables o sospechosos	<3.0 cm	Media 5.1 años	CC o mastectomía sin disección axilar + RT si >70 años	401	19 (5)	No evaluada
Martelli et al(46)	1996-2000	Media 76 años	Ganglios clínicamente no palpables o sospechosos	Cualquier tamaño (93% T1/T2)	Media 15 años	CC + disección axilar	109	0	96
						CC sin disección axilar	110	2 (1.8)	94
Hughes et al(47)	1994-1999	>70 años	Ganglios clínicamente no palpables o sospechosos	<2.0 cm	Media 5 años	CC + TAM	200	0	87
						Mastectomía parcial + TAM	204	2 (1)	86
Rudenstam (44)et al	1993-2002	Media 74 años	Ganglios clínicamente no palpables o sospechosos	Cualquier tamaño (56% <2 cm)	Media 6.6 años	Mastectomía o CC + disección axilar	234	2 (1)	75
						Mastectomía o CC sin disección axilar	239	6 (3)	73

Abreviaturas

RL: recurrencia loco regional, SOG: sobrevida global, CC: cirugía conservadora, TAM: tamoxifeno

a: diferencia no estadísticamente significativa entre los grupos.

b: incluye recurrencias en axila, supraclavicular / subclavicular o ganglios de la mamaria interna

c: excluye 68 pacientes las cuales tenían metástasis axilares luego de la mastectomía total y fueron sometidas a disección axilar

### 1.1.3.2 Disección axilar completa versus radioterapia

Mucho antes de establecer la eficacia de la BSGC en pacientes con CM, existió interés de utilizar la radioterapia (RT) como alternativa a la disección axilar completa. El uso de RT se concentró en pacientes sin evidencia clínica de nódulos palpables o sospechosos y en tumores T1 o T2 (Tabla 1.II.).

En uno de los estudios aleatorizados más extensos, Louis - Sylvestre et al (48) aleatorizaron 658 pacientes con edad menor de 70 años a recibir una mastectomía parcial (cirugía conservadora de la mama, CC) asociada a disección axilar completa o CC asociada a RT axilar. Todos los pacientes recibieron RT sobre el volumen mamario. Luego de 15 años de seguimiento, no existieron diferencias en la supervivencia global entre los grupos, con un 75% de SG en el grupo tratado con disección axilar y un 74% de SG en aquellas pacientes que recibieron RT axilar como único tratamiento sobre los ganglios axilares. Las recurrencias axilares fueron del 1% luego de la disección axilar y del 3% luego del uso de RT axilar ( $p = 0.4$ ). Sorprendentemente, el análisis anatomopatológico de las piezas de disección axilar mostro que un 21% de las pacientes tenían metástasis axilares. A pesar de este alto porcentaje de compromiso axilar presente en ambos grupos, la tasa de recurrencias expresadas como ganglios palpables en axila fue realmente baja en el grupo que recibió solo RT axilar.

En un estudio similar, Veronesi et al (49) encontraron igualmente una baja una tasa de recurrencias axilares (0.5%). De esta forma la tasa de recurrencias axilares puede ser disminuida cuando se incluye la axila en el campo de RT en los casos en los que no se realiza ningún tipo de cirugía sobre la misma. De igual forma Hoebbers et al (45) estudiaron 105 casos sometidos a cirugía conservadora asociada a RT complementaria sobre el volumen mamario, incluyendo un campo extendido a la axila y los ganglios supraclaviculares; no encontrando ninguna recidiva regional aislada (en ausencia de recidivas a distancia concomitantes).

Tras 15 años de seguimiento el estudio Copenhagen Breast Cancer (50) mostró resultados similares. La utilización de RT axilar como tratamiento primario (sin ningún otro tipo cirugía sobre la axila) en pacientes sin ganglios axilares palpables o sospechosos, consiguió un adecuado control local sin comprometer la supervivencia global. Está claro que esta modalidad terapéutica no provee información sobre la presencia o no de compromiso axilar, hecho que actualmente implica que el uso de RT sobre la axila en casos de BSGC negativas es innecesario resultando en un sobre tratamiento.



Tabla 1.II. Estudios sobre disección axilar versus radioterapia axilar.

Fuente	Período de estudio	edad	Estado Axilar	Diámetro tumoral	seguimiento	Intervenciones	Muestra	RL Nº (%)	SG % (SE) <sup>a</sup>
Johansen et al(51)	1951-1957	Cualquier edad (70% ≥50 años)	Ganglios palpables o sospechosos ≤2.5 cm o no palpables / sospechosos en la exploración clínica	cualquiera	Media 50 años	Mastectomía total + RT	219	No informada	1% (65% mortalidad específica)
						Mastectomía radical extendida <sup>b</sup>	206	No informada	2% (64% mortalidad específica)
Louis-Sylvestre et al (48)l	1982-1987	Media 50 años	Ganglios no palpables / sospechosos en la exploración clínica	<3.0 cm clínico	Media 5 años	CC + disección axilar <sup>c</sup>	326	2 (0.6) <sup>d</sup>	75
		Media 52 años				CC + RT sobre axila	332	6 (1.8) <sup>d</sup>	74
Hoebbers et al (45)	1983-1997	Media 64 años	Ganglios no palpables / sospechosos en la exploración clínica	media 2.0 cm clínica	Media 3.4 años	CC + RT sobre axilar y supraclavicular	105	2 (2)	83
Veronesi (49)et al,	1995-1998	Media 57 años	Ganglios no palpables / sospechosos en la exploración clínica	<1.5 cm anatomía patológica intra operatoria	Media 5.2 años	CC sola (sin tratamiento axilar)	214	3 (1.5)	95
						CC + RT sobre axila	221	1 (0.5)	97

RL: recurrencia loco regional, SOG: sobrevida global, CC: cirugía conservadora, TAM:: tamoxifeno. a: diferencia no estadísticamente significativa entre los grupos. b: Mastectomía radical extendida con disección axilar y supraclavicular. c: RT supraclavicular si metástasis identificadas por estudio patológico, d: P = 0.4 para la comparación entre ambos grupos.

### 1.1.3.3 Disección axilar completa vs BSGC

Las primeras investigaciones sobre la aplicabilidad de la BSGC estuvieron destinadas a validar el procedimiento (en cuanto a validez interna y validez externa), confirmando su sensibilidad para identificar el compromiso axilar y reflejar en forma certera el estado del resto de los ganglios axilares (11, 30, 52-55).

El más extenso de estos estudios fue el NSABP B-32 (30) ; este estudio incluyó pacientes con carcinoma ductal invasor (CDI) o carcinoma lobular invasor (CLI) sin ganglios axilares palpables o sospechosos de compromiso metastásico (Tabla 1.III.). Un total de 2807 pacientes fueron aleatorizadas a recibir una BSGC seguida de un vaciamiento axilar completo y otras 2804 pacientes fueron sometidas a una BSGC seguidas de observación en caso de la presencia de un GC negativo o de disección axilar completa en caso de evidencia de compromiso metastásico del GC. Tras un seguimiento medio de 95.5 meses, 8 pacientes del grupo sometido a BSGC seguida de vaciamiento axilar (0.4%) presentaron una recurrencia axilar, 14 pacientes del grupo

sometido a BSGC y vaciamiento axilar solo en caso de compromiso metastásico del GC presentaron una recidiva axilar ( $p = 0.22$ ) No se observaron diferencias significativas en la supervivencia entre los grupos de estudio.

Otros estudios de diseño similar y un metá análisis de los mismos mostraron resultados concordantes (30, 52, 54, 56-58) El mencionado meta análisis no reveló diferencias entre la BSGC y el vaciamiento axilar completo ni en supervivencia global (SG), intervalo libre de enfermedad (ILE) o recurrencias ganglionares loco regionales, en pacientes sin ganglios axilares palpables o sospechosos y BSGC con resultado negativo. La evidencia acumulada muestra que la BSGC, comparada con el vaciamiento axilar, es capaz de identificar en un 90% a 99% de los casos la presencia de metástasis axilares cuando éstas están presentes (54). La tasa de falsos negativos de la BSGC varía entre un 1% a un 10%, lo cual despierta cierto temor a posibles futuras recurrencias; sin embargo la tasa de recurrencias observada se sitúa entre un 0% y un 3% (53), lo cual sustenta su uso en pacientes sin evidencia de ganglios palpables o ecográficamente sospechosos.

Tabla 1.III. Estudios sobre disección axilar versus sola BSGC.

Fuente	Período de estudio	edad	Estado Axilar	Diámetro tumoral	seguimiento	Intervenciones	Muestra	RL Nº (%)	SG % (SE) <sup>a</sup>
Veronesi et al(11, 54)	1998-1999	Media 56 años Para el grupo de disección axilar completa Media 55 años Para el grupo de solo BSGC	No ganglios palpables o sospechosos en la exploración clínica	$\leq 2.0$ cm en anatomía patológica	Media 7.9 años	CC+ BSGC negativa	167	2 (1.2)	89
						CC+ BSGC y disección axilar completa <sup>b</sup>	92	0	89
						CC+ BSGC y disección axilar completa <sup>c</sup>	257	0	89
Canavese et al (58)	1998-2001	Media 58 años	No ganglios palpables o sospechosos en la exploración clínica	$< 5.0$ cm en anatomía patológica	Media 5.5 años	CC o MR + BSGC negativa	79	0	94
						CC o MR + disección axilar completab	31	0	90
						CC o MR + disección axilar completa	115	1 (0.9)	90
Manse (53)l et Al <sup>d</sup>	1999-2003	Media 57 años	No ganglios palpables o sospechosos en la exploración clínica	Cualquier tamaño (74% $< 2.0$ cm)	Media 1 años	CC o MR + BSGC negativa	368	1 (0.8)	98
						CC o MR + disección axilar completa	496	3 (0.6)	98
						CC o MR + BSGC + disección axilar completa	83	0	98

						CC o MR + BSGC RT axilar si BSGC positiva	33	<sup>0</sup>	98
Zavagno et al (57)	1999-2004	Media 57 años	No ganglios palpables o sospechosos en la exploración clínica	≤3.0 cm clínico	Media 4.6 años	CC o MR + BSGC negativa	218	1 (0.4)	87
						CC o MR + BSGC + disección axilar completa	94	<sup>0</sup>	89
						CC o MR + BSGC + disección axilar completa	352	<sup>0</sup>	89
Krag et al (30)	1999-2004	Cualquier edad (75% ≥50 años)	No ganglios palpables o sospechosos en la exploración clínica	Cualquier tamaño (98% ≤4.0 cm)	Media 7.9 años	CC o MR + BSGC negativa	1978	8 (0.4)	83
						CC o MR + BSGC negativa + disección axilar completa	2011	14 (0.7)	84

RL: recurrencia loco regional, SOG: sobrevida global, CC: cirugía conservadora, RM: mastectomía radical, BSGC: biopsia selectiva del ganglio centinela. a: diferencia no estadísticamente significativa entre los grupos. b: disección axilar completa: solo si la BSGC revela compromiso metastásico. c: disección axilar completa: independientemente del resultado de la BSGC. d: estudio cerrado prematuramente debido a los beneficios mostrados en el grupo de BSGC.

#### 1.1.3.4 BSGC sola en GC positivo

Algunos de los estudios ya mencionados muestran los beneficios de un tratamiento multimodal del CM, que implican la utilización de cirugías menos extensas. Estos estudios muestran también que tratamientos no quirúrgicos como la RT o el uso de quimioterapia (QT) sistémica pueden efectivamente tratar las metástasis axilares. Estas observaciones ponen bajo cuestión la necesidad de la disección axilar aun en casos en los cuales el GC presenta compromiso metastásico.

Para poner a prueba este paradigma, el estudio ACOSOG Z0011 incluyó pacientes portadoras de un carcinoma de mama con tumores clínicos T1 y T2 (0.1 – 5 cm) N0M0 y sometidas a un tratamiento conservador y BSGC. Los criterios de exclusión fueron el uso de RT parcial sobre la mama, la presencia de T3/T4 (>5 cm o compromiso de pared torácica/piel), ganglios axilares palpables/sospechosos, y 3 o más GC metastásicos. Las pacientes fueron aleatorizadas a observación o disección axilar. Todas las pacientes recibieron RT sobre el volumen mamario, aunque los campos de RT no fueron especificados en el protocolo de investigación. 97% recibieron tratamiento sistémico adyuvante. Los objetivos finales del estudio fueron la supervivencia global y la recurrencia local. Hay que destacar que el estudio fue cerrado antes de completar el

reclutamiento de pacientes previsto debido a la baja tasa de recurrencias en ambos grupos de tratamiento. Finalmente fueron aleatorizadas 892 pacientes, con una media de seguimiento de 6.3 años. El análisis de los resultados fue hecho en base al tratamiento recibido. 32 pacientes del grupo de disección axilar no recibieron disección axilar alguna, y 11 pacientes del grupo BSGC fueron sometidos a disección axilar. 2 de las 420 pacientes sometidas a disección axilar (0.5%), y 4 (0.9%) de las 436 pacientes sometidas a BSGC sola presentaron una recurrencia axilar ( $p = 0.45$ )(59) El seguimiento a 10 años de este trabajo publicado recientemente muestra unas tasas de recidiva axilare acumulada del 1,5% en el grupo de BSGC sola y del 0,5% en el grupo de pacientes sometidas a Vax ( $p=0,36$ ).

Estos resultados han sido recientemente avalados por otros estudios publicados como el del International Breast Cancer Study Group Trial 23 – 01(60) y el estudio After Mapping the Axilla: Radiotherapy or Surgery (AMAROS) de diseño similar (Tabla 1.IV.)

Tabla 1.IV. Estudios sobre disección axilar versus sola BSGC en casos de GC metastásico.

Fuente	Período de estudio	edad	Estado Axilar	Diámetro tumoral	seguimiento	Intervenciones	Muestra	RL N° (%)	SG % (SE) <sup>a</sup>
Giuliano et al (61)	1999-2004	Media 56 años	No ganglios sospechosos en la exploración clínica	$\leq 3.0$ cm clínico	Media 6.3 años	CC+ BSGC positivo + disección axilar completa	388	2 (0.5)	88.8
		Media 54 años				CC+ BSGC positivo	425	4 (0.9)	89.9
Straver et al (62)	2001-2005	Media 57 años	No ganglios sospechosos en la exploración clínica	$\leq 3.0$ cm clínico	ND	CC o MR + BSGC negativo	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
						CC o MR + BSGC + disección axilar completa	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
						CC o MR + BSGC positivo + RT axilar	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
Galimberti (60) et al,	2001-2010	Media 54 años	No ganglios sospechosos en la exploración clínica	$\leq 5.0$ cm en el análisis intra operatorio	Media 5 años	CC o MR + BSGC positivo + disección axilar completa	464	1 (0.2)	87.8
						CC o MR + BSGC positivo	467	4 (0.8)	84.4

RL: recurrencia loco regional, SOG: sobrevida global, CC: cirugía conservadora, RM: mastectomía radical, BSGC: biopsia selectiva del ganglio centinela. a: diferencia no estadísticamente significativa entre los grupos. b: reclutamiento planeado 4767 pacientes, resultados pendientes de publicar.

Consecuentemente cabría preguntarse si se puede evitar la linfadenectomía axilar en pacientes con BSGC positiva. Existen al menos 4 estudios aleatorizados en pacientes con CM temprano, ganglios axilares clínicamente negativos y BSGC positiva que plantean evitar la linfadenectomía en estas pacientes.

Uno de ellos es el ya analizado más arriba, ACOZOG Z0011(61). Aunque controvertido, este estudio ha supuesto un cambio de paradigma. En él pacientes portadoras de una CM cT1-T2 N0 pero con GC positivo (hasta dos GC positivos) y sometidas cirugía conservadora de la mama más RT complementaria fueron aleatorizadas a observación versus linfadenectomía axilar. No se alcanzó el reclutamiento de pacientes previsto (891 pacientes de las 1900 previstas) y la SG fue el objetivo primario. Luego de 6,8 años de seguimiento no se observaron diferencias en SG y las RL axilares fueron menos del 1% en ambos grupos de tratamiento. Los resultados del estudio ACOZOG Z0011 han supuesto un cambio de paradigma apoyado por otros estudios.

El IBCSG 23-01(60) aleatorizó entre observación y linfadenectomía axilar, a pacientes con CM y tumores cT2 -2 N0 pero con GC positivo con afectación microscópica (N1mic). El tratamiento quirúrgico podía ser tanto cirugía conservadora como mastectomía. Todas las pacientes sometidas a cirugía conservadora recibieron RT y se irradiaron las estaciones ganglionares en aquellas pacientes sometidas a linfadenectomía y que tenían 4 o más ganglios positivos. Contrariamente al estudio anterior, el objetivo primario era la supervivencia libre de recidiva (SLR). Igualmente, este estudio tuvo un cierre prematuro al incluir solo 934 pacientes de las 1960 previstas. Tras de 5 años de seguimiento no hubo diferencias en la tasa de SLR, que fueron solo del 1% en ambos brazos de tratamiento (63).

El estudio AATRM 048/13/2000(64) es un estudio español que también incluyó como el anterior, pacientes con afectación ganglionar micrometastásica. Los criterios de inclusión fueron pacientes con CM y cT <3,5 cm N0 y GC positivo pNmic. Nuevamente las ramas de aleatorización fueron linfadenectomía versus observación y el punto final fue la supervivencia libre de enfermedad. La cantidad de pacientes incluidas fue menor que en los estudios anteriores (247 pacientes) y no mostro diferencias entre las ramas de tratamiento tras 5 años de seguimiento.

Finalmente, el estudio AMAROS(65) aleatorizó pacientes, con CM cT1-2 N0 y GC positivo sometidas a cirugía conservadora o mastectomía, con la diferencia que los brazos de tratamiento fueron linfadenectomía axilar versus RT en axila incluyendo los

tres niveles y supraclavicular. El objetivo primario fue la RL a 5 años. El reclutamiento de pacientes fue el mayor de los 4 estudios reseñados, 1435 pacientes. Tras un seguimiento de 6,1 años no existieron diferencias entre ambas modalidades de tratamiento (RL menores del 2%)

Los 4 estudios tienen algunas similitudes tanto en su diseño como en sus resultados. Los pacientes eran clínicamente N0, recibieron tratamiento sistémico, no hubo diferencias en SG o RL, y bajas tasas de RL axilar (menores al 2%)

### **1.1.3.5 Resultados adversos relacionados con la cirugía axilar**

Tanto la cirugía axilar como la RT pueden causar síntomas a nivel del hombro o miembro superior como linfedema, dolor, entumecimiento y disminución de la movilidad (Tabla 1.V.) La incidencia de complicaciones depende también de la metodología usada para valorar los síntomas y el período considerado entre el tratamiento axilar recibido y la valoración de estos. Factores como la obesidad o el estadio tumoral avanzado (16) pueden aumentar la morbilidad.

En el estudio ALMANAC (53), tanto la morbilidad sobre el hombro como sobre el miembro superior fueron exhaustivamente evaluados luego de tratamiento axilar en múltiples períodos del seguimiento. La disección axilar estuvo asociada con una significativa reducción de la flexión y abducción del hombro 1 mes después de la cirugía, aunque retornó a la movilidad basal medida antes de la cirugía dentro de los 12 meses. 62% de las pacientes presentaron dolor o entumecimiento en el miembro superior dentro del mes posterior a la cirugía, y 31% de las pacientes continuaban con los síntomas a los 12 meses; aunque estos síntomas fueron calificados como severos solo en un 1% de los casos. Contrariamente a otros signos o síntomas, la prevalencia de linfedema generalmente aumenta con el tiempo de seguimiento. La sensación subjetiva de linfedema es manifestada por alrededor del 14% de las pacientes sometidas a disección axilar(52), de un 4% de las pacientes sometidas a RT(53) y en un 5% a 7% de las paciente sometidas a BSGC (17).

Muchos otros estudios randomizados han mostrado una reducción de la morbilidad sobre el hombro o sobre el miembro superior al comparar la BSGC con la disección axilar (17, 52, 57, 61, 66).

Tabla 1.V. Morbilidad a largo plazo asociada con las intervenciones terapéuticas sobre la axila

Resultados	Disección axilar	BSGC
Linfedema	10-20(17, 53)	5-7(17, 53)
Reducción de la calidad de vida	35(17)	23(17)
Dolor / entumecimiento del brazo	31(17)	11(53)

## 1.2 El rol de la linfangiogénesis en cancer

La importancia de las metástasis linfáticas está bien reconocida tanto en lo referente a la estadificación como al tratamiento. El estado linfonodal determina, en casos de tumores sólidos como el cáncer de mama, la necesidad de tratamiento multimodal. Sin embargo, el proceso que determina la invasión linfática y las metástasis en los ganglios regionales, y si los tumores promueven linfangiogénesis (el crecimiento de nuevos vasos linfáticos) en forma similar a la angiogénesis, permanece poco entendido(67).

El sistema linfático funciona como un conducto para fluidos ricos en proteínas extravasadas desde el sistema cardiovascular, con un rol crítico en mantener la homeostasis de los tejidos y la absorción de grasa desde el intestino; jugando un papel esencial en la vigilancia inmunitaria. Consiste en una red hierática de vasos, comenzando en capilares cuya pared está formada por tres líneas de células endoteliales linfáticas (CEL), hacia vasos de mayor calibre los cuales eventualmente se comunican con el sistema venoso.

Contrariamente al sistema vascular, los capilares linfáticos carecen de membrana basal y pericitos, mostrando infrecuentes espacios (gaps) endoteliales; estando fijos a la matriz extracelular por medio de fibras elásticas. Esta arquitectura impide que los vasos colapsen ante cambios de la presión intersticial y facilita la incorporación de componentes tisulares solubles. Los vasos linfáticos colectores presentan válvulas que impiden el flujo reverso y tienen un revestimiento de fibras musculares lisas perivasculares que permiten la propulsión de la linfa(68).

El evento más temprano en el desarrollo del vaso linfático es la transcripción del factor de desregulación “prospero homeobox1” (Prox-1) (69) en la subpoblación de células endoteliales de la vena cardinal, la cual a través de brotes sucesivos dará origen al sistema linfático. El fenotipo vascular es el destino predeterminado de las células endoteliales embrionarias primitivas, que bajo la expresión del factor Prox-1 adoptan el



fenotipo vascular linfático (70) En los últimos 15 años, se ha descubierto, tanto en muestras de tejido como en modelos animales, que el endotelio linfático expresa marcadores específicos que permiten su identificación y distinción del endotelio vascular.

El sistema de señales más importante para el desarrollo de la linfangiogénesis y la formación de nuevos linfáticos está formado por una familia de proteínas (factor de crecimiento vascular endotelial VEGF) asociadas a su receptor. Los miembros de la superfamilia de factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF) incluyen muchos variantes del PDGF y los factores de crecimiento vasculares endoteliales (VEGFs)(71) Esta última familia de factores de crecimiento glicoproteicos comprende los factores VEGF-A/B/C/D/E y el factor de crecimiento placentario (PLGF).

Todos ellos se ligan en forma selectiva a una superfamilia de receptores tirosina quinasa (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular VEGFR 1/2/3)

Los receptores VEGFR1/2 están presentes en la superficie de las células endoteliales sanguíneas. El VEGFR-3 está presente en el desarrollo embrionario tanto en las células de los vasos sanguíneos como linfáticos; sin embargo, en el adulto se restringe solamente a superficie de las células de vasos linfáticos.

El factor de crecimiento vascular endotelial C (VEGF-C) es un factor quimiotáctico y de supervivencia durante el desarrollo de la linfangiogénesis y es necesario para la ramificación de los primeros vasos linfáticos a partir de las venas embrionarias. Así por ejemplo una delección homocigota del VEGF-C redonda en la completa ausencia de vasos linfáticos en embriones de ratas. Por el contrario, una delección del VEGF-D no afecta el desarrollo de los vasos linfáticos, aunque el aporte exógeno de VEGF-D puede rescatar el deficiente desarrollo del sistema linfático en embriones con delecciones VEGF-C.

El desarrollo vascular es mediado a través de las señales del receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-3). Un déficit del VEGFR-3 provoca un defecto en el remodelamiento vascular y una muerte embrionaria, teniendo una función importante en el desarrollo vascular temprano.

Los mecanismos moleculares y celulares de la linfangiogénesis tienen una vía común tanto en el embrión como en los adultos. La vía común es la del receptor VEGFR-3. Se ha llegado a esta conclusión usando anticuerpos que bloquean el VEGFR-3,



suprimiendo la formación de nuevos vasos linfáticos. Los VEGF-C/D son sometidos a un proceso proteolítico que produce las isoformas inmaduras 31/29kD, las cuales exclusivamente activan el VEGFR-3, y formas maduras 21kD que aumentan su afinidad por el VEGFR-3 con capacidad adicional para unirse con el VEGFR-2.

### **1.2.1 Los factores linfangiogénicos VEGF-C/D y el receptor VEGFR-3**

Los factores VEGF-C/D son ligandos para el receptor de tirosina kinasa VEGFR-3 (figura 1.3.) El eje VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 constituye en sistema de traducción de señales para el crecimiento de las células endoteliales linfáticas, su migración y supervivencia. Las formas maduras son dímeros VEGF de dominio homólogo, que se unen al receptor con mucha más afinidad que las formas completas (no seccionadas mediante proteólisis) La estimulación del VEGFR-3 protege a las células endoteliales linfáticas de la apoptosis e induce su crecimiento y migración(72).

Los efectos específicos del VEGF-C están críticamente afectados por su proceso proteolítico in vivo. El proceso proteolítico de los factores VEGF-C/D también activa el VEGFR-2 y puede inducir crecimiento de vasos sanguíneos. Contrariamente el VEGF-A, el cual es factor un angiogénico primario que se une al VEGFR-2, puede inducir hiperplasia linfática pero no sustituir al VEGF-C en el desarrollo linfático.

El eje VEGF-C/VEGFR-3, a través de la sobreexpresión de la contactina – 1 y la activación de la vía de la proteína quinasa C src – p 38 mitógeno activada, puede regular la capacidad invasora de diferentes tipos células cancerígenas y contribuir a la promoción de las metástasis.

Los datos que sostienen que la expresión de factores linfangiogénicos promueven la aparición de metástasis provienen de estudios in vitro e in vivo(73).

La sobreexpresión del VEGF-C en estudios inmunohistoquímicos ha sido asociada a peor pronóstico en cáncer de mama, colorectal, gástrico, tiroides y próstata.

De forma similar la sobreexpresión de VEGF-D confiere, peor pronóstico en casos de cáncer de ovario y páncreas. La expresión del VEGFR-3 en las células endoteliales linfáticas ha sido asociada con la presencia de metástasis ganglionares en cáncer de próstata.

Estudios en modelos animales han demostrado que el eje VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 está implicado en los procesos de linfangiogenesis tumoral y en la diseminación metastásica de células tumorales(74)(figura 1.3.)

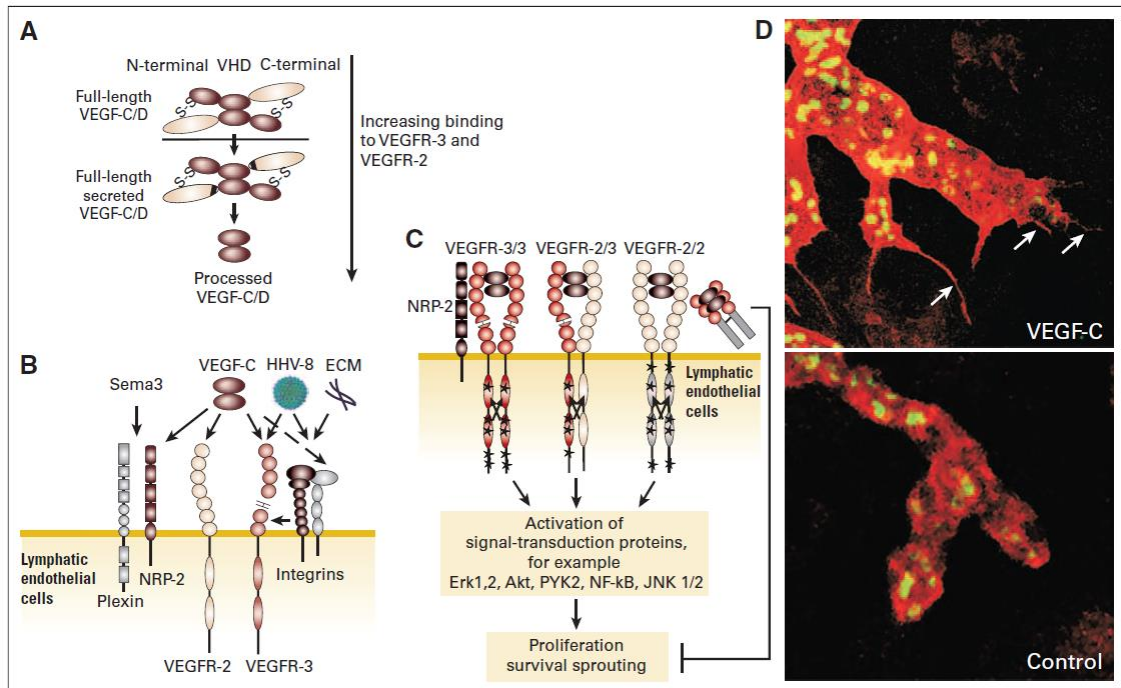


Figura 1.3. Factores de crecimiento endotelial vascular C (VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3) en la regulación del crecimiento del sistema vascular linfático. Proteínas de la matriz extra celular (ECM). Neurolipina (NRP)

La sobreexpresión de VEGF-C en líneas celulares de cáncer de mama en ratones aumenta la linfangiogenesis tumoral, y resulta en un aumento significativo de las metástasis en los ganglios linfáticos regionales. Además la sobreexpresión del VEGF-C induce la expansión de los vasos linfáticos en los ganglios centinelas antes del establecimiento de las metástasis y promueve la presencia de metástasis en ganglios no centinelas(75). Por otra parte, el factor VEGF-C induce la quimotaxis de macrófagos, revelando una función potencial como inmunomodulador.

He et al investigaron como las células tumorales acceden al interior de los vasos linfáticos y como las mismas pueden iniciar el proceso metastásico(76). El factor VEGF-C induce un extenso proceso de brotes linfáticos hacia las células tumorales, dilatación de los linfáticos de drenaje, y un significativo aumento del crecimiento luego de 2 a 3 semanas del xenotransplante, con la consiguiente presencia de metástasis ganglionares. Así mismo, tanto la linfangiogenesis como las metástasis linfonodales son inhibidas por la presencia de anticuerpos anti VEGFR-3 (figura 1.4.)

Aunque los receptores VEGF se encuentran tanto en células normales como cancerígenas, su inhibición podría afectar mayormente a las células tumorales, debido al menos en teoría , al crecimiento más rápido de los vasos sanguíneos en el interior tumoral(71).

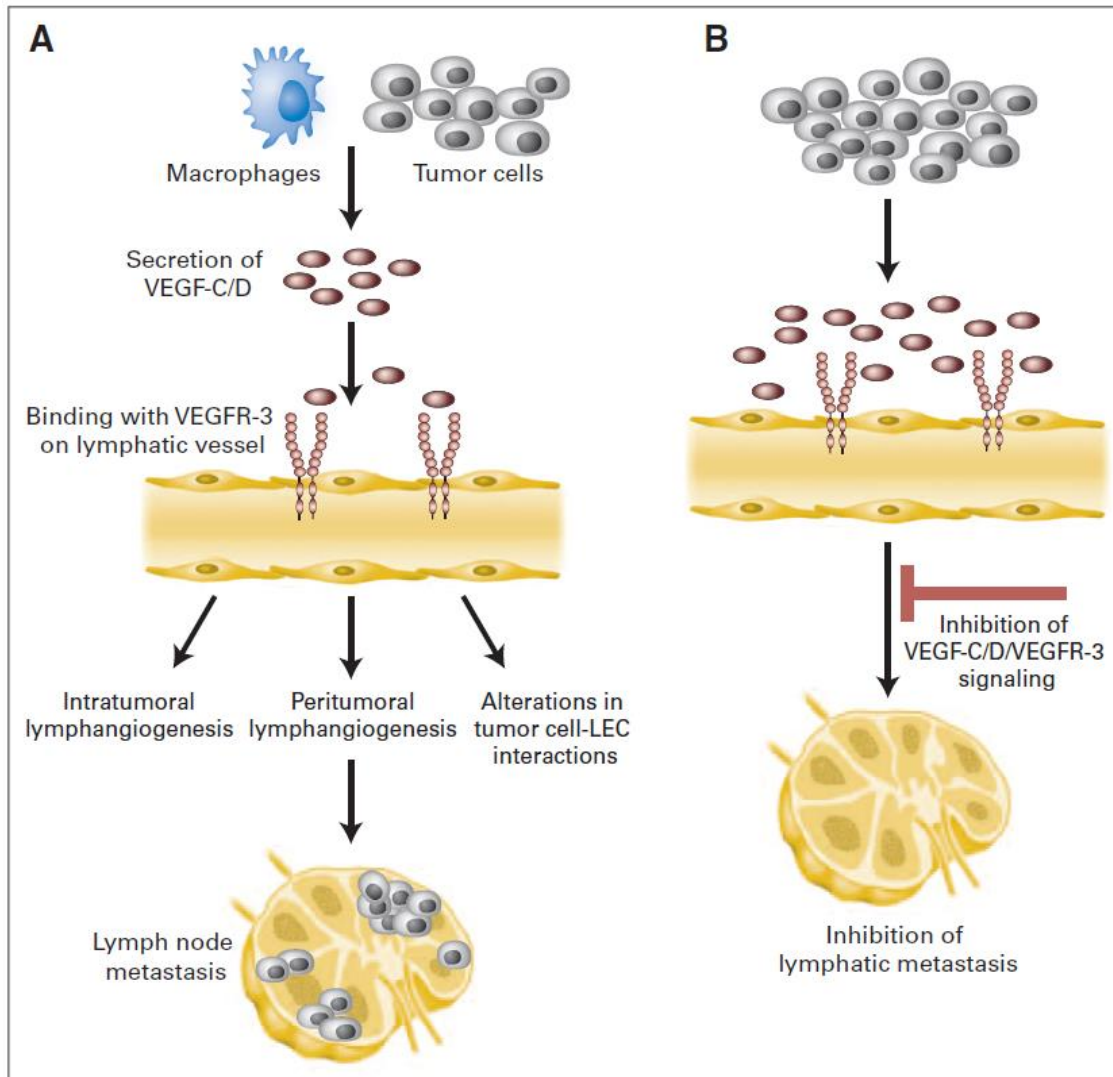


Figura 1.4. Concepto actual en el proceso de metastasis linfáticas

### 1.2.2 Significado pronóstico del factor VEGF-C tisular

Actualmente no parece haber dudas de que los factores miembros de la familia VEGF juegan un importante papel en la biología del cáncer de mama y que su estudio como posibles factores pronósticos es prometedor.

Mohammed et al, analizando muestras de tejido tumoral en parafina de pacientes con CM primario, encontró una relación significativa entre la expresión tumoral de VEGF-C y la densidad microvascular y linfovascular ( $p = 0.002$ ). También encontraron una relación significativa entre la expresión del factor VEGF-C y la presencia de metástasis ganglionares axilares ( $p = 0.001$ )(77) Los tumores mayores de 1,5 cm presentaban una expresión significativamente mayor del factor VEGF-C. Los mismos autores relacionaron en forma significativa la expresión del factor VEGF-C con una disminución de la supervivencia global ( $p = 0.025$ ). Otros autores también han encontrado una relación significativa entre la expresión (sobre expresión o expresión alta) del factor VEGF-C y factores tanto clínicos como pronósticos. Nakamura et al (78) encontraron una significativa asociación con la presencia de metástasis ganglionares ( $p = 0.001$ ) y metástasis a distancia ( $p = 0.008$ ); así como con un mayor riesgo de recurrencia locoregional ( $p = 0.025$ ) y de peor SG ( $p = 0.028$ ).

Los estudios más tempranos no distinguían entre vasos sanguíneos y linfáticos debido a la falta de marcadores específicos para los vasos linfáticos. La aparición de marcadores como LYVE-1, Prox y podoplanin/D2-40 han permitido establecer esta distinción. Usando estos biomarcadores junto con inmunohistoquímica, se ha mostrado una amplia evidencia de que las células del cáncer de mama tienen preferencia por invadir los vasos linfáticos (79). Esta evidencia está basada en varios estudios. Una de las mayores series hasta el presente (con 1408 casos de cáncer de mama) mostró la presencia de invasión linfovascular en el 34% de los casos, mientras solo el 4,2% de los casos evidenció la invasión del espacio vascular sanguíneo (80).

Liang et al (81), en un metaanálisis publicado en 2014 sobre 14 estudios prospectivos y retrospectivos (incluyendo 1.573 pacientes con CM) ,encontraron que la expresión del factor VEGF-C se relacionó con la presencia de metástasis ganglionares ( efecto fijo OR = 2.14,  $p= 0.009$ ) Igualmente la expresión del factor VEGF-C se asoció con una pobre sobrevida global (OR = 2.46,  $p = 0.001$ ) y una menor sobrevida libre de enfermedad ( efecto fijo OR = 2.10,  $p = 0.002$ ).

Esta evidencia ha dado origen en los últimos años a estrategias terapéuticas como la interferencia ARN, una tecnología usada para silenciar la expresión genética. Shibata et al (82) investigaron si la inhibición de los factores VEGF-A y VEGF-C podría ser usada para suprimir la presencia de metástasis tanto hematógenas como linfáticas en líneas celulares mamarias de ratones inmunocompetentes; creando un ambiente similar al de los cánceres de mama humanos. La incidencia de metástasis ganglionares en el grupo

de tratamiento con psiARN-VEFG-C fue del 60% menor respecto al grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. También fue menor la presencia de células malignas dentro de la microvasculatura linfática, indicando la supresión de la migración de las células tumorales.

### **1.2.3 Factor VEGF-C , linfangiogénesis y presencia de metástasis en el ganglio centinela en cáncer de mama.**

Durante mucho tiempo se pensó que el compromiso metastásico ganglionar se producía en forma pasiva, mediante la diseminación de las células tumorales a través de vías linfáticas preexistentes localizadas en la vecindad del tumor.

Recientes estudios han demostrado que las células tumorales de diferentes neoplasias inducen linfangiogénesis en el ganglio centinela antes de la presencia de metástasis.

La linfangiogénesis es un proceso dinámico que genera nuevos vasos linfáticos a partir de vasos preexistentes durante la embriogénesis, pero es relativamente raro en la edad adulta.

Se estima que el 80% de las metástasis en los tumores sólidos, como el CM y el melanoma maligno, disemina a través del sistema linfático, mientras que el restante 20% lo hacen directamente en los vasos sanguíneos(69). Las células malignas diseminadas a través de los vasos linfáticos pueden eventualmente producir metástasis linfonodales (llamadas en tránsito o lesiones satélites), mediante la proliferación in situ dentro de los mismos vasos. Actualmente existe discusión sobre el impacto pronóstico de la presencia de células tumorales aisladas o micrometástasis (0,2 – 2 mm) en los ganglios linfáticos; aunque en algunos tipos tumorales está asociado con un aumento de la mortalidad (figura 1.5.)

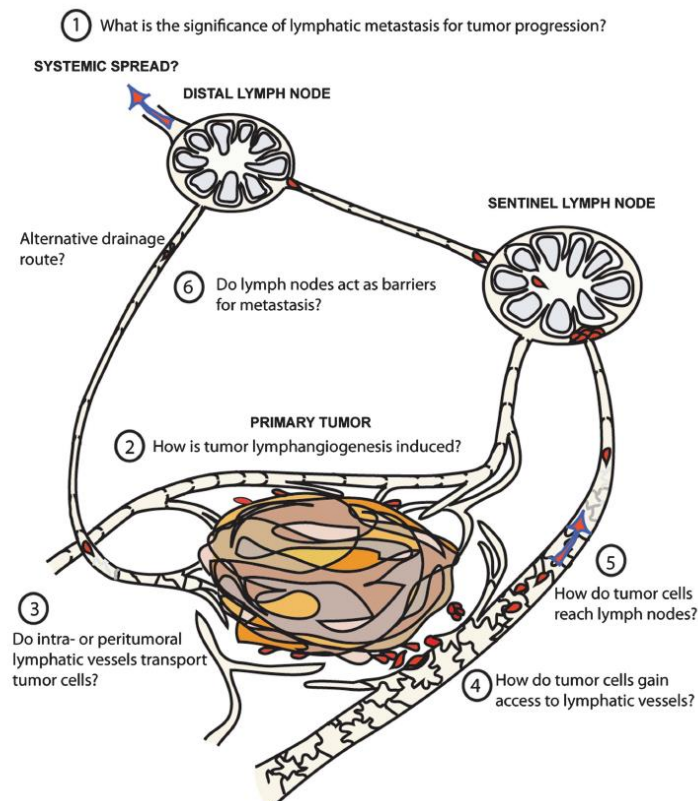


Figura 1.5. Posibles vías de diseminación metastásica en el sistema linfático.

Si las células tumorales utilizan vasos preexistentes para metastatizar, las terapias anti-linfogénesis no serán útiles o suficientes para la prevención de la aparición de metástasis ganglionares. Sin embargo, la presencia de vasos linfáticos intratumorales indica la activación de los fenómenos de linfangiogénesis dentro del tumor. En muchos estudios se ha observado una correlación entre la densidad de vasos linfáticos y la presencia de metástasis tanto ganglionares como a distancia (79, 83). Los mismos sostienen el concepto que cuanto mayor es la densidad de la vasculatura linfática dentro o cercana al tumor, mayor es la posibilidad de que células tumorales entren en los vasos linfáticos y den origen a la diseminación metastásica.

El mecanismo de como las células tumorales entran en los vasos linfáticos es poco conocido. Una opción es la inclusión de las células tumorales por el desarrollo y crecimiento de los brotes de vasos linfáticos durante la linfangiogénesis y su migración a través de endotelios; en forma similar a los leucocitos. Aunque algunos estudios recientes muestran que células del cáncer de mama pueden invadir activamente los vasos formados por linfangiogénesis induciendo la formación de espacios entre las células endoteliales.



La detección de células endoteliales linfáticas en división (LEC) es el centro de una controversia sobre si las metástasis linfáticas ocurren a través de vasos preformados o de nuevos vasos linfáticos. La respuesta a esta cuestión ha sido dada usando anticuerpos específicos como marcadores linfáticos (LYVE-1 y D2-40) combinados con anticuerpos marcadores de proliferación como el Ki-67 o el PCNA. Por ejemplo, usando la tinción doble Ki-67/podoplanin en una serie de CM invasor (N = 177) se encontró que el 29% de las muestras mostraban núcleos positivos para Ki-67 en el 2,2% de los linfáticos intratumorales, peritumorales o periféricos. La frecuencia de positividad nuclear estuvo significativamente asociada a la presencia de metástasis linfonodales, la densidad de vasos linfáticos y la SG (84).

Igualmente, los estudios que comparan el porcentaje de LEC en CM inflamatorios y no inflamatorios encontraron que los primeros tienen una alta incidencia de linfáticos Ki-67 positivos (80% vs 50%) y una media significativamente mayor del porcentaje de LEC(85).

La presencia de una linfangiogénesis activa también fue demostrada en GC positivos, los cuales mostraron un porcentaje de LEC significativamente mayor que los casos con GC negativo ( $p < 0,001$ )(86). Igualmente, una alta positividad del Ki-76 en los vasos linfáticos de los GC positivos fue fuertemente relacionada con la presencia de otros ganglios positivos axilares no centinelas ( $p = 0,01$ ), sosteniendo la hipótesis de que la inducción de la linfangiogénesis promueve la diseminación tanto desde el tumor primario como desde sitios secundarios de metástasis (86).

Un anormal aumento de la presión intersticial dentro de los tumores ha sido propuesto como causa para forzar el movimiento de células tumorales dentro del drenaje linfático. En pacientes afectados de melanomas malignos y sobreexpresión del factor VEGF-C, se ha observado un flujo linfático multidireccional anormal; sugiriendo un insuficiente funcionamiento de las válvulas linfáticas. Un flujo anormal dentro de los vasos linfáticos puede permitir un estancamiento de las células tumorales y su crecimiento in situ, hasta alcanzar una masa crítica que necesite de mayor aporte de oxígeno a través de vasos sanguíneos.

Numerosos estudios sugieren que los vasos linfáticos facilitan la aparición de metástasis comportándose como un portal para la diseminación tumoral. Comparados con los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos ofrecen muchas más ventajas para la invasión y transporte de células malignas pre metastásicas: 1) una membrana basal discontinua y pérdida de las uniones celulares, 2) una tasa de flujo mucho menor que podría aumentar

la sobrevida , y 3) unas 100 veces más concentración de ácido hialurónico, con propiedades que mejoran la supervivencia celular(79).

Se han encontrado niveles altos de VEGF-C en tejido de metástasis ganglionares de pacientes con diversos tipos de tumor sólido. (83). Así mismo, usando modelos animales, los niveles tisulares de los factores VEGF-C/D se han relacionado con la presencia de un aumento de la densidad de vasos linfáticos, el diámetro de estos vasos y la presencia de metástasis ganglionares y orgánicas.

Podríamos decir que existen actualmente dos modelos de diseminación metastásica. Un modelo, llamado modelo de diseminación hematógena, que es linfático independiente. Este concepto implica que la linfangiogénesis no es inducida, o en caso de que lo sea, los nuevos vasos linfáticos no contribuyen a la diseminación tumoral. La idea está basada en que la principal vía de diseminación metastásica es a través de los vasos sanguíneos intratumorales, los cuales entregaran células metastásicas a órganos distantes como pulmón, hígado, hueso o SNC. Basándonos en este modelo, las células tumorales pueden invadir linfáticos peritumorales preexistentes que las transportan hacia los ganglios locoregionales. De todas formas, las metástasis derivadas de la invasión de los ganglios linfáticos no contribuirán a la producción de metástasis a distancia. Los autores que sostienen este modelo se basan en la falta de impacto en la SG, demostrada en estudios clínicos, de la linfadenectomía. El segundo argumento que sostiene este modelo es la noción de que la diseminación metastásica es órgano específico, y por lo tanto las células metastásicas dentro de la circulación linfática establecen lesiones dentro del sistema linfático, pero sin tener la capacidad de desarrollar metástasis a distancia.

Un segundo modelo en cáncer de mama que podríamos llamar linfático dependiente o secuencial, sugiere que los tumores mamarios inducen linfangiogénesis intra y peritumoral, así como una remodelación del sistema linfático en el GC y en otros NoGC. Esto se manifiesta, como se ha descrito previamente, mediante el aumento del número de vasos linfáticos, aumento de la frecuencia de la división de las células endoteliales linfáticas y aumento del flujo linfático entre el tumor primario y el GC. Desde allí las células tumorales puede usar tanto el sistema linfático como los vasos sanguíneos para su diseminación posterior a través del conducto torácico.

Ambos modelos no son mutuamente excluyentes, y en algunos tumores la diseminación hematógena y linfática puede ocurrir simultáneamente (figura 1.6.)



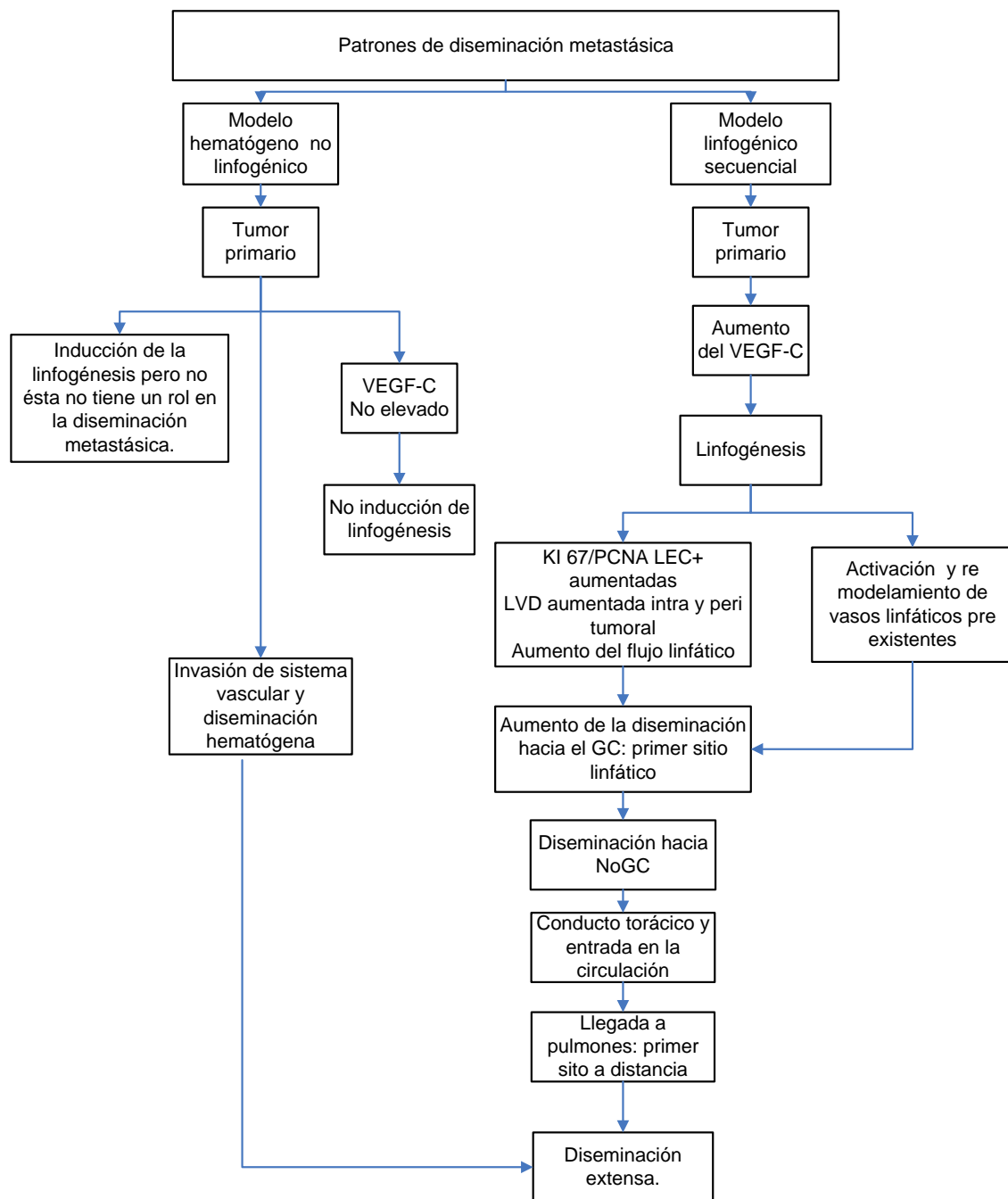


Figura 1.6. Modelos de diseminación metastásica.

Aun hoy, en oncología clínica, el GC juega un importante papel en el diagnóstico, estadificación y manejo del cáncer de mama. Aunque cerca de 2/3 de los casos de cáncer de mama no muestra compromiso linfonodal, de ellos un tercio recurrirán en el futuro(87). Los ganglios linfáticos constituyen un verdadero cruce entre proteínas filtradas, células de respuesta antigénica, linfocitos y eventualmente células tumorales. Aun en ausencia de metástasis tumorales, los ganglios linfáticos pueden presentar hiperplasia, dado que la respuesta inmune está asociada a cambios en diferentes parámetros, como acumulación de linfa, migración y proliferación (88).

Liersch et al (88) investigaron los cambios tempranos que se producen en los ganglios linfáticos de ratones inmunodeprimidos tras inyectar células provenientes de melanomas manipuladas genéticamente para hacerlas fluorescentes con el colorante verde MDS-MB-435 y que sobreexpresaban el factor VEGF-C. En casos de GC negativo determinaron el grado de linfangiogénesis, angiogénesis y el tamaño del GC. El factor VEGF-C es capaz de inducir hiperplasia sinusal en el GC aun antes de la presencia de metástasis ganglionares produciendo un aumento significativo del área de vasos linfáticos ( $p = 0.05$ ); no encontrando diferencias en cuanto a la capacidad de inducir aumentos de densidad de la red vascular sanguínea ni en el tamaño de los ganglios linfáticos. Estos resultados siguieron que el aumento de la linfangiogénesis en los GC, aun no comprometidos por la presencia de metástasis, puede ser un nuevo y temprano marcador de agresividad.

La invasión vascular linfática esta significativamente asociada a la de metástasis en el GC, en ganglios no centinelas, así como en la evolución del cáncer de mama. Metástasis en GC han sido detectadas en hasta un 51% de los casos con invasión vascular linfática y comparada con solo el 30% de los casos sin invasión vascular (79).

Muchos estudios correlacionan la expresión de los factores VEGF-C/D con la inducción de la linfangiogénesis, la presencia de metástasis axilares y la evolución de los pacientes con cáncer de mama (tabla 1.VI)(79). Han sido publicados estudios que muestran valores elevados de VEGF-C en el tejido tumoral en un 30% a 40% de los casos de CM, niveles que han sido asociados con una alta incidencia de invasión linfovascular, presencia de metástasis ganglionares y menor SLE y SG(89).

Igualmente, estos estudios, muestran la presencia de expresión del factor VEGF-C en el 39% de las células tumorales del CM ( $N = 98$ ) y su ausencia en las células glandulares normales adyacentes (89).

Otras publicaciones muestran además una expresión del factor VEGF-C en el 48% de 133 (90) y en el 87% de 123 (78) tumores de mama; con una correlación significativa entre la expresión del factor VEGF-C, la invasión linfo vascular, la presencia de metástasis linfonodales y la SLE y la SG. Además, como ya se ha expuesto anteriormente, la célula tumoral puede inducir linfangiogénesis y flujo linfático en el GC y en otros ganglios no centinelas, este proceso ha sido llamado linfangiogénesis linfonodal. Estos cambios se producen antes de la detección de metástasis, indicando un aumento del riesgo de su presencia. Se ha detectado un aumento del tamaño ganglionar acompañando la linfangiogénesis, manifestado por una aumento del

número de vasos linfáticos sinusoidales y un aumento de sus respectivos diámetros (91).  
Figura 1.7.

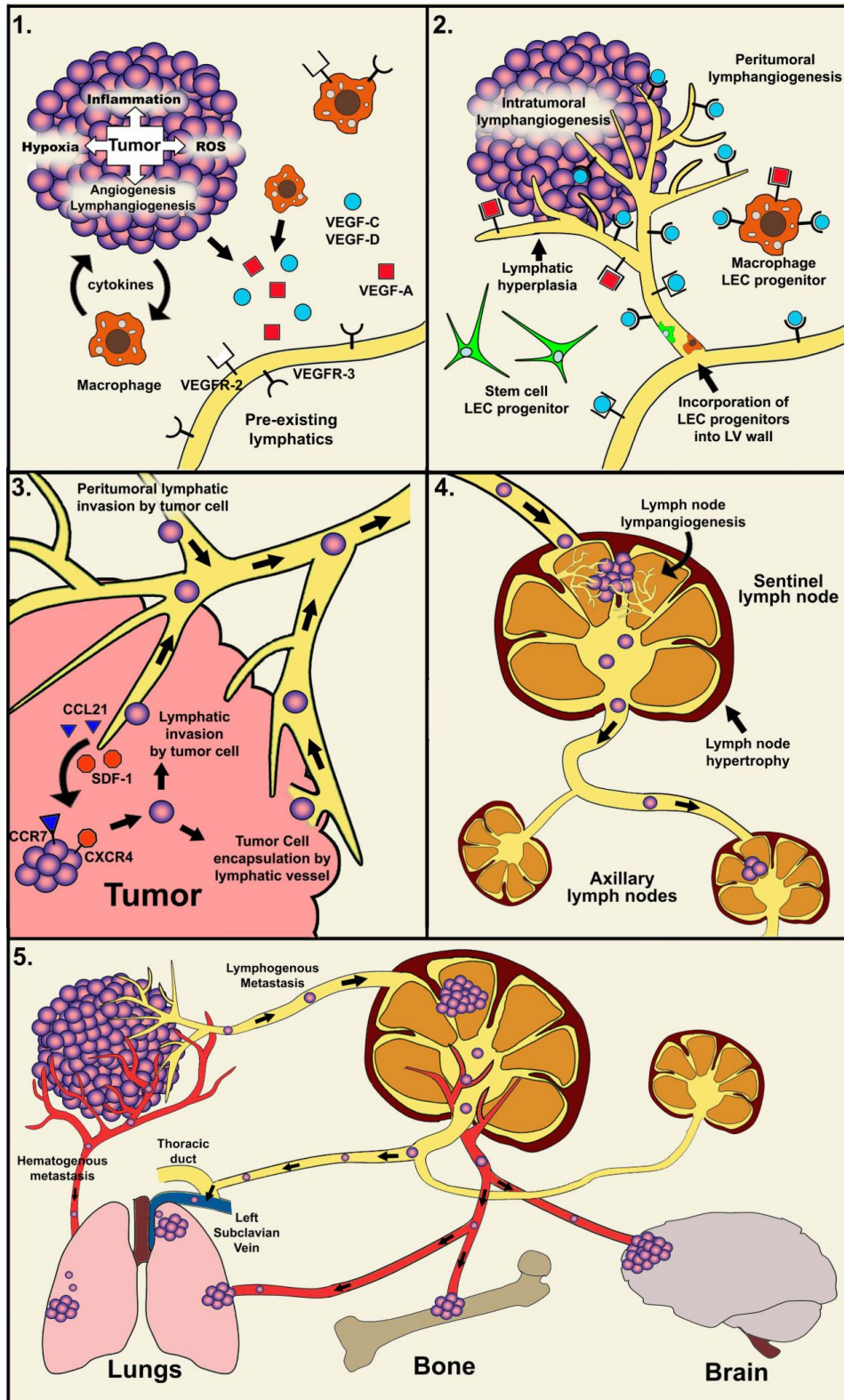


Figura 1.7. (79). Mecanismos de las metástasis linfáticas. 1) la inflamación, la hipoxia y factores reactivos a oxígeno (ROS) producen una sobre regulación de la expresión de factores pro linfogenicos como VEGF-C/D/A producidos por las células tumorales y el tejido estromal asociado al tumor (macrófagos y fibroblastos). 2) los nuevos vasos linfáticos se forman principalmente en la región peri tumoral, y en algunos casos en la región intra tumoral. La formación de nuevos vasos linfáticos comprende la activación del receptor VEGFR-3 a través de factores como VEGF-C/D y del receptor

VEGF-2 a través del factor VEGF-A. Acto seguido células endoteliales linfáticas en división (LEC) proliferan, migran y se adhieren dentro de los nuevos vasos .3) Las células tumorales invaden en forma activa los vasos linfáticos intra y peri tumorales o podrían ser encapsuladas por los vasos linfáticos. Ambos tipos de interacciones provocan un aumento de la invasión vascular linfática de los GC. 4) factores tumorales como VEGF-C/A producen profundos cambios morfológicos en el GC terminando en un proceso de linfogénesis e hipertrofia linfática. EL flujo linfático aumenta en forma notable tanto dentro como fuera del GC promoviendo mas metástasis linfáticas y metástasis a distancia. 5) La vía de diseminación a distancia puede ocurrir tanto a través de vasos sanguíneos como linfáticos. Luego del compromiso del GC por diseminación linfática, las células tumorales entra en la circulación sanguínea a través de los vasos sanguíneos ganglionares, o provenientes del flujo linfático usando la vía del conducto torácico.

En contraste otros autores no encontraron una correlación significativa entre la expresión del factor VEGF-C y la presencia de invasión linfovascular o la presencia de metástasis linfonodales (92, 93).

Tabla 1.VI Correlación entre VEGF-C/D y la presencia de metástasis linfáticas

Autor	Nº pacientes	Comentarios	Valor p
Mohammed et al (77)	177	VEGF-C tuvo una alta expresión en 31% de las muestras. VEGF-C estuvo asociado con un alto LVD ( $p = 0,014$ , presencia de metástasis ganglionares ( $p < 0,001$ ) y a distancia ( $p = 0,008$ ) y menos SG ( $p = 0,020$ )	$p < 0,001$
Nakamura et al (78)	123	VEGF-C detectado en el 87% de las muestras. Altos niveles de VEGF-C estuvieron asociados a menor SLE y SG ( $p = 0,0165$ y $p = 0,0175$ )	$p = 0,0131$
Nakamura et al (90)	113	Los niveles de VEGF-C mRNA se correlacionaron con LVD ( $p = 0,04$ )	$P = 0,0074$
Gisterek et al (94)	98	Sin correlación entre la expresión de VEGF-C/D y el tamaño tumoral, grado tumoral, expresión de receptores de estrógeno y metástasis axilares.	NS
Li et al (95)	80	La presencia de VEGF-C estuvo significativamente asociada a un aumento peri tumorales de LVD, invasión linfática y número de ganglios positivos.	$P = 0,003$
Hoar et al (93)	70	Tanto VEGF-C como COX-2 se correlacionaron con la presencia de metástasis linfonodales	$P = 0,01$
Zhang et al (96)	51	Sin relación significativa entre VEGF-C y el estado linfonodal, invasión vascular linfática, tamaño tumoral o grado tumoral.	NS
Koyama et al (92)	33	La expresión de VEGF-C mRNA se correlacionó con la presencia de metástasis ganglionares.	NS
Choi et al (97)	29	La presencia intra tumoral de VEGF-C/D no se correlacionó con la densidad vascular	$P = 0,414$

Ying-Chun Zhao et al (98) analizaron la expresión de VEGF-C/D en tumores primarios de mama T1N0/T2N0 y su relación con la presencia de linfangiogénesis en el ganglio centinela. Encontraron que altos niveles de expresión de VEGF-C no estuvieron significativamente asociados a altos niveles de expresión del factor VEGF-D. La expresión del factor VEGF-C no estuvo significativamente asociada con la edad, el grado tumoral, el receptor de estrógeno o de progesterona o el estado HER 2 Neu. Los tumores con una alta expresión del factor VEGF-C estuvieron asociados a la presencia de altos niveles de VEGFR-3 y marcadores de linfangiogénesis como LYVE-1 y Prox 1 en el ganglio centinela ( $p = 0,05$ ). No sucediendo lo mismo con los tumores que expresaban altos niveles de factor VEGF-D.

Otros factores también han sido implicados en el fenómeno de linfangiogénesis: angiopoyetinas (Ang-1, Ang-2, Ang-3), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-

2), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de insulina (IGF -1, IGF-2), factor de crecimiento hematopoyético (HGF) y la hormona del crecimiento (GH). Aunque extensos y circunstanciales trabajos correlacionan estos factores tanto con la formación de vasos como la aparición de metástasis, ninguno de ellos examina la relación con la aparición de linfangiogénesis, invasión linfática y metástasis en cáncer de mama (79)

#### **1.2.4 Niveles séricos del VEGF-C como factor pronóstico**

Se han detectado valores elevados de VEGF en suero de pacientes con diferentes tumores, tanto en pacientes con enfermedad localizada como en aquellos con enfermedad metastásica (99). La valoración de la expresión de VEGF ya sea por inmunohistoquímica o por inmuno ensayo de extractos de tejidos ha mostrado una significativa correlación con la densidad microvascular. En pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos el VEGF se ha mostrado como un fuerte predictor de la SLE y la SG(100).

Claramente, las determinaciones de marcadores de angiogénesis solubles circulantes deberían de ser consideradas más objetivas que otras más subjetivas como las determinaciones inmunohistoquímicas o por inmunoensayo; los cuales son además mucho más laboriosas.

Muchos autores han investigado la posible relación entre los niveles séricos del VEGF y su significado pronóstico en cáncer de mama. No todos se han limitado solo a estudiar específicamente a VEGF-C y la casi totalidad de los trabajos publicados solo se refieren al VEGF en forma genérica sin distinciones dentro de esta superfamilia y relacionándolo principalmente con la angiogénesis, lo cual probablemente se deba que el factor estudiado haya sido el VEGF-A. Por lo que existe escasa información publicada acerca de la utilidad de los valores séricos de VEGF-C y parámetros clínico-patológicos, así como su valor pronósticos relacionado con la afectación ganglionar, la SG y la SLE.

Se han detectado niveles elevados de VEGF en pacientes con cáncer de mama, demostrándose una significativa correlación con una elevada densidad intratumoral de microvasos y que los mismos constituyen un factor pronóstico independiente de sobrevida global. Además el equilibrio entre factores pro angiogénicos y antiangiogénicos está influenciado por la activación de las vías intracelulares del factor



de crecimiento epidérmico (EGFR-HER2), y como consecuencia de esto el aumento de las síntesis de VEGF(101).

Las formas solubles del VEGF son detectadas en circulación y muchos estudios han demostrado niveles séricos elevados de VEGF en pacientes con tumores sólidos incluyendo tumores de útero, colon, recto, pulmón y sistema nervioso central; permitiendo generar la hipótesis de que los niveles de VEGF pueden tener valor predictivo ante la progresión de la enfermedad. Los niveles circulantes de VEGF pueden ser un marcador subrogado de angiogénesis, de gran ayuda en el proceso de toma de decisiones relacionadas con el uso de quimioterapia(102).

Análisis experimentales ha demostrado grandes discrepancias entre los niveles séricos y plasmáticos de VEGF. Estas diferencias han sido explicadas recientemente mediante el descubrimiento de grandes cantidades de VEGF en los megacariocitos (103). Además, los niveles séricos de VEGF se correlacionan con el recuento plaquetario, siendo el VEGF liberado en suero por medio de la activación plaquetaria producida por la flebotomía. Se ha propuesto entonces analizar los niveles de VEGF en plasma inmediatamente después de ser aclarado de plaquetas luego de realizar el acceso venoso.

Desde hace dos décadas se sabe que el VEGF es liberado por las plaquetas cuando éstas son estimuladas por la trombina in vivo. Henk et al - 1997 - (104) estudiaron 19 pacientes con carcinoma de mama localmente avanzado y tratados con quimioterapia dentro de un estudio fase II. Encontraron una alta correlación ( $r=0.8$ ;  $p<0.01$ ) entre los niveles séricos del VEGF y el recuento plaquetario. Comparando los valores de VEGF en suero y en plasma, encontraron que los niveles plasmáticos de VEGF fueron significativamente menores que los valores séricos ( $p<0.001$ ).

Algunos autores han investigado la utilidad de los niveles séricos de VEGF como herramienta diagnóstica en cáncer de mama. Granato et al - 2004- (99) realizaron un estudio de casos y controles en pacientes sanas y en pacientes con cáncer de mama diagnosticadas dentro de un cribado poblacional. Los valores séricos de VEGF fueron determinados en 54 pacientes sanas y en 69 pacientes con cáncer de mama. Las determinaciones serológicas se realizaron usando el inmunoensayo enzimático con la técnica de sándwich (Quantikine). En su estudio básico, los valores séricos de VEGF no estuvieron relacionados con la edad, el tamaño tumoral o el compromiso ganglionar. Los niveles séricos tuvieron un rango del 22,7 al 953,5 pg/ml, y no estuvieron

relacionados con ninguna variable biológica o patológica. En el estudio de casos y controles los valores séricos de VEGF de pacientes sanas y de pacientes con cáncer de mama tuvieron un considerable solapamiento. Las curvas ROC desarrolladas no encontraron una concentración sérica de corte aceptable en términos de sensibilidad o especificidad.

Tampoco los resultados del grupo de Reeves et al (105) mostraron interacción entre los valores séricos de VEGF y el riesgo de padecer cáncer de mama tanto en pacientes pre como post menopáusicas.

Stathopoulos et al (106) analizaron los niveles plasmáticos de VEGF usando la técnica cuantitativa de inmunoensayo (Quantikine). 93 pacientes con cáncer de mama fueron incluidas en el ensayo; 46 pacientes sin evidencia de recurrencia y 47 pacientes con enfermedad metastásica. No encontraron diferencias estadísticas entre los dos grupos. En los individuos sin evidencia de enfermedad los niveles en plasma de VEGF fluctuaron en forma similar a los pacientes con evidencia de recaída, entre valores de 5-680 pg/ml.

De igual forma, Quaranta et al (107) analizando los niveles séricos de VEGF de 88 pacientes con cáncer de mama (Quantikine Human VEGF) no encontraron diferencias entre los diferentes tipos histológicos (CDI vs otros  $p > 0,05$ ) o los diferentes estadios de la enfermedad (estadio I vs otros  $p > 0,05$ ). Los niveles de VEGF detectados en estadios tempranos de la enfermedad no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes comparaciones racionadas con el estado de los receptores hormonales, el tipo histológico, o el estadio de la enfermedad. Tampoco entre los niveles séricos de las pacientes afectas de cáncer de mama y 20 voluntarias sanas.

Tampoco Hodorowiz et al (108) lograron encontrar diferencias entre los valores séricos de VEGF de 87 pacientes con cáncer de mama. El análisis estadístico no mostro ninguna correlación entre las concentraciones séricas de VEGF y parámetros como el estadio de la enfermedad, el diámetro del tumor, el estado de compromiso ganglionar, el grado histológico, la presencia de invasión vascular, el tipo histológico o la presencia de receptores para hormonas, o la presencia de expresión del oncogén Her 2 neu. Tampoco encontraron los autores correlación entre los niveles de VEGF y otros marcadores como CEA o CA 15,3.

Zhang et al (109) en un grupo de 65 pacientes con cáncer de mama, analizaron diferentes factores pronósticos serológicos (VEGF, CA 15-3, CA 125 y CEA). Los

autores no encontraron diferencias en la expresión serológica del VEGF en diferentes estadios de la enfermedad ( $p>0.05$ ) Tampoco encontraron relación entre los niveles en suero de VEGF y la presencia de metástasis ganglionares ( $p>0.05$ ) Por el contrario los niveles de VEGF y otros marcadores en suero fueron mayores en el grupo de pacientes con recaídas de la enfermedad ( $p<0.01$ ).

Recientemente Falk et al (110) , en un estudio prospectivo pre diagnóstico , analizaron los niveles séricos de VEGF en 352 pacientes con cáncer de mama y 423 pacientes sanos mediante la técnica de sandwich ELISA (Quantikine). Los autores no observaron un perfil angiogénico (hazard ratio) entre los casos y los controles (media casos = 290,8, media controles = 288,4). Sorprendentemente, en las pacientes con cáncer invasor, los valores séricos de VEGF fueron menores en las pacientes diagnosticadas dentro del primer año de la toma de la muestra ( $p = 0,099$ ).

Las experiencias que analizan la relación entre los niveles de VEGF (no precisamente el VEGF-C) en pacientes sometidas a la BSGC son pocas, y no están diseñadas para analizar esta relación como principal punto de hipótesis.

Rocca et al en 2009 (101) analizaron los valores séricos de VEGF en pacientes con cáncer de mama T1–T2 y N0-2. Las concentraciones de VEGF fueron determinadas mediante inmunoensayo enzimático cuantitativo tipo sándwich (Quantikine Human VEGF), y sus concentraciones reportadas en pg/ml. Se obtuvieron muestras de 124 pacientes, con una media de edad de 49 años. La mayoría de las pacientes presentaban un T1 (55%) y un 58% presentaban compromiso axilar. Todas las pacientes fueron sometidas a una BSGC. El valor medio preoperatorio de VEGF fue de 341.73 pg/ml, con un aumento a 346,84 pg/ml el día posterior a la cirugía. Ninguno de los dos niveles, pre o post operatorio, fueron asociados con algunos de los parámetros clínico-patológicos estudiados (edad, tamaño tumoral, estado linfonodal, receptores hormonales, Ki 67, Her 2 Neu o invasión perivascular). Igualmente, los valores séricos preoperatorios de VEGF no estuvieron asociados con la SLE.

Finalmente, algunos autores han explorado la utilidad del VEGF sérico como marcador de respuesta a terapias antiangiogénicas. Por ejemplo, en el contexto del cáncer de mama metastásico oseo, el VEGF puede actuar como factor osteolítico en presencia del Ligando del Receptor Activador para el Factor Nuclear kappa- B (RANKL), promoviendo la mutación y la activación de los osteoclastos. La reducción de los valores séricos del VEGF ha sido observados en casos de respuesta al tratamiento con bifosfonatos (111).



## **2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **2.1 Objetivos**

El objetivo de este estudio es valorar la exactitud relativa del nivel de VEGF-C en suero para evaluar la presencia de metástasis axilares en los ganglios linfáticos en pacientes con cáncer de mama invasivo temprano, y para determinar si los niveles circulantes de VEGF-C podrían dar información adicional para discriminar entre la ausencia y presencia de metástasis en los ganglios linfáticos en pacientes con cáncer de mama temprano.

#### **2.1.1 Objetivos primarios:**

-Establecer si existe correlación entre los niveles séricos de VEGF-C y la afectación tumoral de los ganglios axilares obtenidos mediante BSGC en pacientes con cáncer de mama operable.

-Comprobar si la correlación permite establecer valores de niveles séricos de corte con suficiente poder predictivo que pudieran obviar la estadificación ganglionar de la axila mediante biopsia selectiva del ganglio centinela y/o linfadenectomía axilar.

#### **2.1.2 Objetivos secundarios:**

-Establecer si existe correlación entre los niveles séricos de VEGF-C y la afectación tumoral del resto de ganglios axilares obtenidos mediante linfadenectomía en las pacientes que presentan ganglio centinela positivo.

-Establecer si existe correlación entre los niveles sérico de VEGF-C y factores clínicos, histológicos e inmunohistoquímico de influencia pronóstica y predictiva conocida en el cáncer de mama.

-Comprobar si los niveles séricos de VEGF-C pueden formar parte, junto con factores clínicos e histológicos, de un sistema multifactorial de predicción de afectación tumoral de los ganglios axilares con el fin de crear una herramienta con utilidad clínica para la selección de pacientes para la realización de BSGC y linfadenectomía axilar.

-Comprobar correlación en los niveles séricos de VEGF-C y, la SG y la SLE de las pacientes.

## **2.2 Hipótesis**

La hipótesis del presente estudio es que existe una correlación entre niveles elevados de VEGF-C en suero y el riesgo de afectación del ganglio centinela en cáncer de mama operable. Dado que la determinación de VEGF-C en suero es una técnica sencilla, barata y reproducible, podríamos disponer de un marcador de riesgo de afectación ganglionar que, por sí sólo o combinado con otros factores clínicos o histológicos, permita evitar la realización de la estadificación ganglionar axilar (biopsia selectiva del ganglio centinela) en pacientes con cáncer de mama operable.

### 3 METODOLOGÍA

#### 3.1 Diseño

Estudio prospectivo en una cohorte de 174 pacientes diagnosticadas por primera vez de cáncer de mama en estadio inicial (estadios I o II) operables y candidatas a la realización de una biopsia selectiva de ganglio centinela como procedimiento de estadificación ganglionar axilar. Las pacientes fueron seleccionadas en la Unidad Funcional de Patología Mamaria (UFPM) del Hospital Costa de Sol y, previa firma del consentimiento informado específico para el estudio, se extrajo una muestra sanguínea para la determinación de los niveles séricos de VEGF-C antes del tratamiento quirúrgico primario. Una vez registradas las variables clínicas y patológicas a estudiar se realizó un análisis estadístico para correlacionar las diferentes variables entre sí y se intentó establecer si los niveles de VEGF-C en suero, por sí solos o combinados con otros factores histopatológicos, tenían carácter predictivo para la afectación metastásica del ganglio centinela (figura 3.1.)

Se realizó además la determinación del factor VEGF-C sérico en una serie de casos en mujeres sanas destinado a conocer el valor de a media del mismo en este grupo; con la intención de poder comparar los resultados con el grupo de estudio.

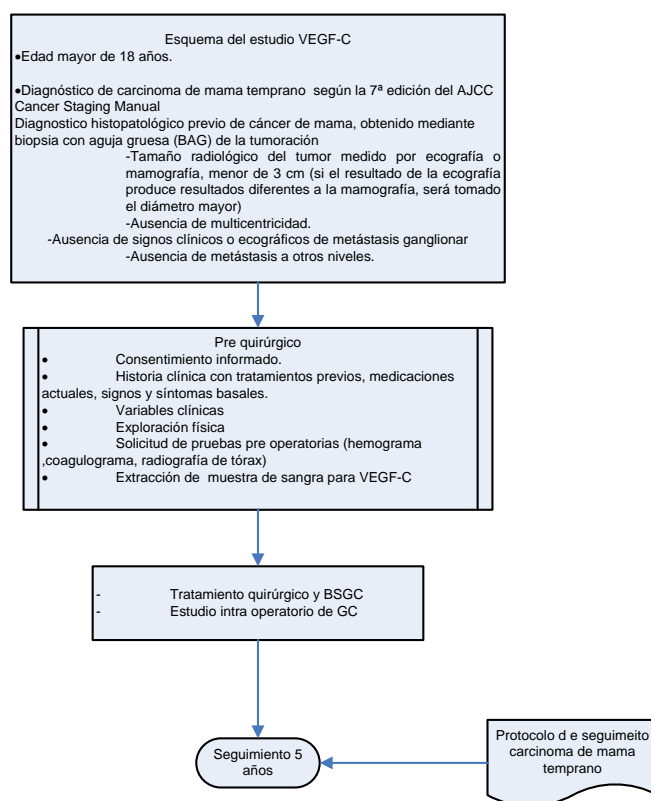


Figura 3.1. Diseño de estudio.

## **3.2 Selección y retirada de los sujetos**

### **3.2.1 Criterios de inclusión**

Se consideraron candidatas participar en el estudio a las pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama en las UFPM del Hospital Costa del Sol de Marbella que cumplieran los siguientes criterios:

- Edad mayor de 18 años.
- Diagnóstico de carcinoma de mama temprano según la 7ª edición del AJCC Cancer Staging Manual (112)
- Diagnostico histopatológico previo de cáncer de mama, obtenido mediante biopsia con aguja gruesa (BAG) de la tumoración, que tuvieran un estadio clínico inicial y que cumplieran las siguientes recomendaciones e indicaciones para ofertar la realización de BSGC:
  - Tamaño radiológico del tumor medido por ecografía o mamografía, menor de 3 cm (si el resultado de la ecografía produce resultados diferentes a la mamografía, sería tomado el diámetro mayor)
  - Ausencia de multicentricidad.
  - Ausencia de signos clínicos o ecográficos de metástasis ganglionar axilar. En caso de duda radiológica sobre el estado axilar, sería necesaria la realización de una punción con aguja fina (PAAF)
  - Ausencia de metástasis a otros niveles.
- Analítica sanguínea y radiografía de tórax negativa.
- Conocimiento previo de los objetivos del estudio y firma de consentimiento informado antes de la extracción de la muestra sanguínea.
- Tanto la biopsia previa, como los procedimientos quirúrgicos (cirugía del primario, BSGC y posterior linfadenectomía si es necesaria) debían llevarse a cabo en el mismo hospital donde se llevó a cabo el estudio de investigación (Hospital Costa de Sol)

### **3.2.2 Criterios de exclusión**

- Carcinoma de mama previo o contralateral metacrónico.

- Antecedentes de alergia que contra indique la BSGC
- Historia de cualquier neoplasia diferente de carcinoma de piel no melanoma.
- Enfermedad intercurrente que impida la participación en el estudio  
Imposibilidad de comprender el alcance de estudio y prestar consentimiento informado o seguir las instrucciones que se den al paciente

### **3.2.3 Criterios de retirada de un sujeto**

- Imposibilidad de detección del ganglio centinela  
Los sujetos retirados del estudio fueron reemplazados mediante el reclutamiento de nuevos sujetos hasta completar el tamaño muestral.  
No fue necesario el seguimiento de los sujetos retirados del estudio.

### **3.2.4 Criterios previstos para la retirada de los sujetos del estudio**

De acuerdo con la Declaración de Helsinki, los pacientes mantuvieron su derecho a retirarse del estudio en cualquier momento y por cualquier motivo, pudiéndolo expresar personalmente o a través de su representante.

## **3.3 Determinación del tamaño muestral**

El tamaño de la muestra para evaluar la prueba diagnóstica (nivel sérico de VEGF-C), se predeterminó para una prevalencia esperada de afectación tumoral de los ganglios axilares del 25%, con una precisión absoluta del 3%, y un nivel de confianza del 95%, con una especificidad esperada del 95%, se necesitaron reclutar a 170 pacientes con cáncer de mama operable, fijándose el tamaño mínimo muestral en 174 pacientes.

## **3.4 Protocolo del estudio**

Las pacientes seleccionadas en la UFPM como candidatas potenciales a participar en el estudio fueron citadas en Consulta Externa de Unidad de Mama o de Oncología Médica para ser informadas de su diagnóstico, alternativas de tratamiento y de la naturaleza y objetivo de presente estudio. En dicha consulta se obtuvo el consentimiento

informado, se extrajo la muestra sanguínea necesaria y se recabaron las variables clínicas prequirúrgicas.

Antes de 30 días (contados desde la fecha de la obtención del diagnóstico histológico inicial) la paciente fue sometida a la cirugía de la lesión primaria (tumorectomía, cuadrantectomía, mastectomía) y realización de BSGC con la localización del ganglio centinela mediante técnica doble con rastreo isotópico solo o acompañado de colorante vital. En aquellos casos donde la técnica no fue efectiva la paciente no pudo seguir en el estudio.

### **3.4.1 Descripción de los procedimientos del estudio**

#### **3.4.1.1 Toma de muestra de sangre**

Luego de la obtención de consentimiento informado se tomaron dos muestras de cada paciente que contenían 10 ml cada una de sangre periférica, la cual fue procesada dentro de las dos horas de la muestra. De cada muestra, se obtuvo el suero y plasma.

#### **3.4.1.2 Técnica del mapeo linfático**

Preparación del paciente: Ninguna

Radio fármaco, dosis y técnica de administración

- Radio fármaco: Tc99m nanocoloide
- Vía de administración peri tumoral /peri areolar el día previo a la intervención quirúrgica
- Dosis: 5-8mCi en un volumen de 4-5 mL.

Gammacámara:

- Colimador: baja energía, alta resolución, orificios paralelos (LEHR).
- Ventana del isótopo: 20%, centrada en 140 KeV.
- Matriz 128\*128.

Protocolo de adquisición

- Posición del paciente: decúbito supino. En el estudio del territorio axilar se coloca al paciente de la manera más adecuada a criterio médico / técnico.
- Modo: estático.
- Se dejó constancia de los siguientes datos: territorio de drenaje linfático, presencia y número de ganglios centinelas.

Proyección y tiempo de exploración

- Exploración a las 3-24 horas tras la administración del trazador.

- Proyecciones AP y laterales. Proyecciones adicionales en caso preciso.

#### Otras maniobras

- Para una más fácil localización del ganglio hipercaptante o centinela, se marcaron los contornos corporales con un lápiz de Co57, una fuente de Tc99m.
- Marcaje cutáneo con un rotulador en la localización aproximada del o de los ganglios centinelas.
- Utilización de placas de plomo para atenuar el punto de inyección del trazador.

Es importante resaltar que el cirujano realizó una exploración de la zona axilar, pues en caso de adenopatías sospechosas que no capten el trazador, debían de extirparse y analizarse, pues existe siempre la posibilidad de bloqueo linfático por infiltración tumoral (34).

#### **3.4.1.3 Técnica de la Biopsia (Giuliano) y vaciamiento axilar posterior**

Tras la inducción con anestesia general, se inyectó el colorante vital (isosulfan blue dye) con una aguja 25 G dentro de la masa tumoral y en el parénquima mamario alrededor de la misma o preferentemente en forma peri areolar en 4 puntos. El volumen de inyección fue de 3 a 5 ml.

También era aconsejable inyectar el azul (metileno o isosulfán) una vez que la paciente esté intubada, por si existe una reacción alérgica (poco habitual por otro lado).

Si el tumor primario había sido resecado, se podía optar por inyectar el colorante vital en las paredes de la cavidad y/o en el parénquima mamario circundante en varios puntos a lo largo de la incisión.

El intervalo entre la inyección del colorante y la incisión axilar fue de 5 minutos (con un máximo de 20 minutos). Estaba permitido masajear la zona de inyección por 5 a 10 minutos.

Se realizó una incisión transversal de 2 cm, justo debajo de la línea del vello axilar. También pudo ponerse en práctica la técnica de Cox: ubicar el pectoral mayor, el dorsal ancho, trazar una línea transversal a 1 cm por debajo del borde inferior de la línea del vello axilar y otra que desciende de la parte media de la axila. En la unión de esta con la transversal y en un círculo de aproximadamente 5 cm, es posible encontrar el ganglio centinela en un 90% a un 94% de los casos, lugar que corresponde al grupo torácico inferior. Otro reparo que ubicar fue la rama lateral del 3 nervio intercostal.



El lugar a realizar la incisión en piel pudo también elegirse usando la sonda de mano (gamma probe) o ser previamente marcado durante la linfografía radioisotópica.(11)

Se realizó una disección roma hasta encontrar un colector linfático o un ganglio teñido de azul. El colector linfático fue disecado hasta encontrar el primer ganglio axilar de drenaje. Si fue posible el trayecto del colector era seguido próximamente hasta la cola de la mama para asegurar que el ganglio aislado sea el primero de drenaje, el ganglio centinela.

Este ganglio fue resecado con un anillo de tejido circundante, y enviado para examen anatomopatológico, previo lavado con suero.

La diferencia entre las cuentas radioactivas del lecho quirúrgico y del ganglio debían ser como máximo del 10% de las cuentas de este último.

Para pacientes sometidos a un tratamiento conservador y/o una mastectomía, y en caso de BSGC positiva, se realizó un vaciamiento axilar del I y II nivel o radical a elección del cirujano.

#### **3.4.1.4 Definición de Ganglio Centinela y de Falso Negativo.**

El número de ganglios centinelas pudieron ser uno o más. Según Norton y Cochran el GC es el que primero recibe el drenaje axilar. Sin embargo, muchas definiciones se ajustan a la de GC:

1. El ganglio que recibe el drenaje directo del tumor primario.
2. El ganglio más cercano al tumor primario.
3. El ganglio con mayor conteo radioactivo.
4. El primer ganglio mostrado por la linfografía radioisotópica.
5. El ganglio radioactivo.
6. El ganglio que muestra un contero mayor que el lecho quirúrgico.
7. El ganglio "azul".

#### **3.4.1.5 Estudio intra operatorio**

El estudio histológico intraoperatorio del ganglio centinela se realizó según el siguiente protocolo:

Los GC se biseccionaron a lo largo de su eje mayor, y ambos restos se incluyeron en parafina para el análisis histológico posterior. Los ganglios linfáticos menores de 5 mm fueron incorporados sin seccionar. Se realizaron treinta pares de secciones adyacentes, de 4 micras de espesor, a intervalos de 50 micras. Si se tuviera aun tejido residual, se realizaron pares adicionales de secciones cortadas a intervalos de 100 micras hasta que

el ganglio linfático se seccionó por completo. Una sección de cada par se tiñó con hematoxilina y eosina (H & E).

Los pares de secciones incluidas en parafina se contaron a intervalos de 50 y 100 micras y se tiñeron como anteriormente se ha descrito. Los depósitos metastásicos se midieron según los tres ejes, y se registró el tamaño más grande encontrado. El tamaño de los depósitos metastásicos en el plano de las secciones de tejido se midió histológicamente con un micrómetro ocular, y se calculó el espesor de acuerdo con el número de secciones contiguas implicadas y al intervalo de corte entre ellos. Para evitar subestimación del espesor de las metástasis, se incluyeron también los intervalos de corte inmediatamente anteriores a la primera y el siguiente las últimas secciones involucradas. El tamaño más grande registrado corresponde con el diámetro máximo en el plano de la sección o al espesor de los focos metastásicos (lo que sea de mayor tamaño).

Si se identificaron múltiples pero distintas (es decir, separadas por secciones de tejido no afectadas) metástasis en el mismo GC, el tamaño de la metástasis más grande es el que fue registrado.

Desde la introducción del método One Step Nucleic Amplification (OSNA)(113) , el ganglio linfático se homogeneizó durante el estudio usando una técnica molecular. El estudio se realizó mediante un análisis molecular que implica la amplificación en una sola etapa del ácido nucleico mRNA de los ganglios que expresaban citoqueratina-19 (Sysmex®).

Los bloques de tejido congelado usados en la biopsia intraoperatoria (identificados con un número de orden) así como el tejido ganglionar desechado para el estudio intraoperatorio en congelación, fueron fijados en formol e incluidos en parafina para la realización del estudio definitivo (en casos en los cuales no fue usado el método OSNA), en el que se procedió de la siguiente manera:

Cuando el/los ganglios centinelas fueron intraoperatoriamente positivos para metástasis, se procedió a la realización de linfadenectomía axilar reglada con extracción de los ganglios axilares de los dos primeros niveles. Igualmente fue necesaria la realización de linfadenectomía en un segundo tiempo quirúrgico, en aquellos casos en que el estudio histológico diferido de los ganglios centinelas demostró la afectación a ese nivel (macroscópica o microscópica 0,2 mm-2 mm). Por el contrario, en aquellos casos con BGC negativa (no afectación macroscópica o microscópica de ninguno de los ganglios centinelas extraídos), se dio por finalizado el estudio de los ganglios axilares restantes.

El resto de las variables clínicas e histológicas necesarias para completar el estudio de cada paciente se obtuvieron del resultado definitivo histológico de las piezas quirúrgicas y se incorporaron a la base de datos en la consulta de Oncología Médica (cuaderno de recogida de datos).

#### **3.4.1.6 Determinación de los niveles de VEGF-C en suero**

Para la determinación de los niveles séricos de VEGF-C se utilizó el ensayo comercial VEGF-C de QUANTIKINE (R&D) que es un inmunoensayo tipo sándwich que utiliza un anticuerpo monoclonal específico para VEGF-C.

Los detalles del manejo de las muestras y de la realización del inmunoensayo se muestran en el ANEXO I. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

#### **3.4.1.7 Determinación de otras variables**

##### **Ki67**

- Se realizó una tinción inmunohistoquímica y se valoró, usando el microscopio de luz, en forma cuantitativa y visual la proporción de las células malignas con tinción positiva para el antígeno nuclear Ki-67 .
- Los valores de Ki67 se adquirieron como el porcentaje de células malignas marcadas positivamente utilizando el MIB1 (anticuerpo monoclonal Ki-67 antihumano) el cual es uno de los anticuerpos más comúnmente utilizados y considerado como el " estándar de oro ".
- La puntuación de porcentaje de Ki67 se define como el porcentaje de células tumorales teñidas positivamente entre el número total de células malignas evaluadas. La positividad es de interés independiente de la intensidad de la coloración.
- De acuerdo con la experiencia de diferentes patólogos, se definió el punto de corte de 14%, así como de acuerdo las recomendaciones nacionales e internacionales en la actualidad.
- Se analizó la muestra completa y se comprobó la inmunotinción de los núcleos de las células tumorales. La puntuación se llevó a cabo teniendo en cuenta la sección del tumor en su conjunto y no sólo la los puntos calientes de la carcinoma o a las partes positivas más evidentes dentro del segmento invasor o el frente de la zona necrosis. En resumen, el índice Ki67 es el porcentaje de células con inmunotinción nuclear Ki-67-positivas (114).

### **Invasión linfovascular**

- Se utilizaron los criterios Rosen (114)

## **3.5 Variables a estudio**

**3.1.1. Variable principal** (DEPENDIENTE): Afectación del Ganglio Centinela (SI/NO)

**3.1.2. Variables secundarias** (INDEPENDIENTES):

**3.1.2.1. Variables clínicas:**

Edad, estado menstrual (pre o postmenopáusica), tamaño tumoral clínico, tamaño tumoral radiológico, fecha de la última menstruación, fecha de extracción de la muestra sanguínea para determinar VEGF-C, fecha de la cirugía primaria.

**3.1.2.2. Variables analíticas** (variable a estudio):

Niveles séricos de VEGF-C mediante inmunoensayo medidos en pg/ml.

Variables histológicas y/o inmunohistoquímicas:

Tipo histológico, grado de diferenciación tumoral, tamaño tumoral patológico, presencia de invasión linfática intra/peritumoral, presencia de invasión vascular intra/peritumoral, receptores de estrógeno, receptores de progesterona, expresión del receptor Her-2-Neu (mediante herceptest y FISH), nº de ganglios centinelas extraídos, número de ganglios centinelas afectados, tipo de afectación del ganglio centinela (macro o microscópica, tamaño de la afectación microscópica del ganglio centinela (en caso de existir), realización de linfadenectomía axilar (si/no), número de ganglios extraídos en la linfadenectomía axilar, número de ganglios afectados en la linfadenectomía axilar, presencia de afectación extracapsular en los ganglios extraídos en la linfadenectomía axilar (si/no). Recidiva (si/no), tipo de recidiva (local, regional, metastásica), fecha de la recidiva, fecha de último seguimiento, estado (viva/muerta) en la fecha de último seguimiento, muerte (si/no), fecha de la muerte.

## **3.6 Recogida y análisis de los datos**

La recogida de las variables clínicas se realizó en la visita de entrada al estudio y las variables histológicas se recogieron en la visita posterior al tratamiento quirúrgico primario. Los datos referentes a los niveles de VEGF-C se recogieron cuando se realizó el inmunoensayo (en cada Kit de inmunoensayo se pueden analizar unos 39 casos).

Una vez finalizada la determinación de VEGF-C en el último grupo de pacientes se procedió al análisis de los datos según la siguiente metodología estadística:

- En el análisis descriptivo de las variables contempladas en el estudio, se calcularon como estadísticos de tendencia central la media y la mediana, y de dispersión la desviación estándar para las variables cuantitativas. En las variables cualitativas se calcularon las frecuencias absolutas y relativas de cada categoría.

- En el análisis bivariado, se tomó como variable principal la afectación del ganglio centinela para la comparación de subgrupos, para las variables continuas se utilizó la t-Student para muestras independientes (en el caso de  $n > 30$  y distribución simétrica) y el test de la U de Mann-Whitney (en caso contrario), y en cuanto a las variables cualitativas o categóricas se utilizó el test de la Chi-Cuadrado, o de Fisher, en su caso, para las cualitativas. El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0.05$  y, para las variables con magnitud de la asociación clínicamente significativas, en  $p < 0.10$ .

- Análisis multivariante Regresión Logística Múltiple (RLM): Se realizaron modelos de RLM por pasos (step by step), tomando como variable resultado/dependiente la presencia o ausencia de afectación del Ganglio Centinela con objeto de mejorar la predictividad en la elaboración de las Curvas ROC. En un primer paso se forzó la inclusión del Nivel Sérico VEGF-C. En un segundo pasó, se incluyeron en el modelo aquellas variables de ajuste/independiente que mostraron relación en el análisis bivariado con la variable dependiente o que, aunque no alcanzaron el nivel de significación, fueron clínicamente relevantes (criterio de entrada de nuevas variables, nivel de significación según  $p < 0.1$ ). Se presentaron los Odds Ratio junto con sus Intervalos de Confianza al 95% (IC95%).

- Análisis multivariante ROC: se elaboraron curvas ROC (Receiver Operating Characteristics) con objeto de evaluar la capacidad diagnóstica de los modelos obtenidos a partir de las RLM anteriormente comentadas. Se presentaron junto al gráfico de la Curva ROC, y el valor del Área Bajo la Curva con correspondientes IC95%, los puntos de corte de sensibilidad y especificidad por deciles, y los valores predictivos negativos y positivos. El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS/PC versión 12.0.

Para el análisis de los diferentes factores de riesgo para recaída se utilizaron test no paramétricos (prueba de Mann-Whitney)

Para el análisis de SLE se utilizó el test de Regresión de Cox multivariante por pasos - usando valores de VEGF-C corregidos (cociente 1k).

### **3.7 Tabla cronológica del estudio**

Tabla 3.I. Cronología del estudio

Procedimiento	Selección Pre quirúrgico	Visita 1 (Día 1)	Visita 2 (Día 15)	Seguimiento semestral	Visita Fin de estudio (fin de seguimiento)
Consentimiento informado	X				
Historia clínica	X	X	X	X	X
Exploración física	X	X	X	X	X
Hemograma, coagulograma, RxTx	X				
Extracción de sangre para VEGF-V	X				
Mamografía				X	X
Otras (de acuerdo al estadio final)			X		

### 3.8 Procedimientos por visitas

#### 3.8.1 Visita de selección (prequirúrgico)

Se llevaron a cabo los siguientes procedimientos dentro de los 30 días previos a la realización de la cirugía, cumpliendo con los criterios de calidad del Proceso Asistencial Integrado del Cáncer de Mama de la Junta de Andalucía:

- Consentimiento informado.
- Historia clínica con tratamientos previos, medicaciones actuales, signos y síntomas basales.
- Variables clínicas
- Exploración física
- Solicitud de pruebas preoperatorias (hemograma, coagulograma, radiografía de tórax)
- Extracción de muestra de sangra para VEGF-C

Antes de la inclusión de un paciente se le explicó con detalle la naturaleza del estudio, así como los riesgos y beneficios potenciales asociados al ensayo. Los pacientes firmaron el Consentimiento Informado o en su defecto su tutor legal (ANEXO II)

Aquellos pacientes que cumplieron de forma satisfactoria todos los criterios de inclusión fueron incluidos en el estudio

Los fallos en la selección se definieron como aquellos sujetos que han firmado el consentimiento informado específico del protocolo, pero resultaron no elegibles o se retiraron voluntariamente del estudio. Estos sujetos se consideraron no reclutados.

**Visita 1 (Día 1): Hospitalización:**

- Tratamiento quirúrgico y BSGC
- Estudio intraoperatorio de GC

**Visita 2 (Día 15): Oncología médica**

- Resultado anatomía patológica definitivo
- Recolección de variables analíticas y patológicas
- Compilación de cuaderno de recogida de datos (base de datos del estudio)

**Visitas de seguimiento.**

Seguimiento por protocolo de cáncer de mama temprano: semestral.

Se realizaron las siguientes evaluaciones en la visita de seguimiento: Anamnesis dirigida, exploración clínica, mamografía anual. Estudio radiológico de la mama operada (mamografía) a los 6 meses del fin de radioterapia complementaria en caso de cirugía conservadora. Otras exploraciones dirigidas según la sintomatología y/o exploración física.

**3.9 Limitaciones del estudio**

La principal limitación de este estudio proviene del escaso conocimiento biológico que existe acerca del proceso de linfangiogénesis y diseminación linfática tumoral. VEGF-C podría ser un eslabón final en la cadena de activación de la diseminación linfática de la enfermedad, que se active por la expresión de otros factores más importantes que hoy día no son bien conocidos. Ya se sabe que la expresión local de ciclooxigenasa 2 en cáncer de mama y heparinasa en cáncer de cabeza y cuello, activan la linfangiogénesis a través de la producción de VEGF-C en el tumor.

Por otro lado, debido a la ausencia de datos acerca del papel de los niveles séricos de VEGF-C como factor pronóstico o predictivo en cáncer de mama, podía ocurrir que el papel biológico real de este factor linfangiogénesis en la progresión del cáncer de mama, sea menos importante de lo esperado y no tuviera valor predictivo para la afectación axilar.

También se sabe que muchos factores biológicos con poder pronóstico o predictivo pierden su valor cuando se realiza un análisis multivariado en el que se incluyen los



factores clínicos e histológicos clásicos. No se podía descartar que los niveles de VEGF-C estuvieran fuertemente relacionados con otros factores predictivos y perdieran su papel en el análisis multivariado.

A pesar de estas limitaciones potenciales, este estudio fue pertinente por lo siguiente:

1º.- El conocimiento actual de la biología de la linfangiogénesis tumoral ha establecido a VEGF-C como su activador más potente.

2º.- La expresión tumoral de VEGF-C está relacionada con el riesgo de metástasis ganglionares axilares en cáncer de mama operable y los datos disponibles del papel predictivo de los niveles sérico de VEGF-C sobre la diseminación ganglionar en cáncer de pulmón recomiendan la realización de un estudio exploratorio en cáncer de mama. Sobre todo, cuando es el cáncer de mama una neoplasia prevalente en la que podría evitarse un procedimiento quirúrgico (BSGC y/o LA) que no tiene papel terapéutico y que consume importantes recursos sanitarios.

### **3.10 Cronograma (tabla 3.II.)**

El estudio se realizó en el Hospital Costa del Sol de Marbella en base al plan de trabajo que se especifica más abajo. El período de realización del estudio fue de 2 años. Durante los primeros 21 meses se llevaron a cabo las etapas 1 a 4. Estas etapas se solaparon ya que el reclutamiento de los casos fue prospectivo y no se requirió seguimiento posterior al tratamiento quirúrgico de las pacientes más que el determinado por el proceso asistencial integrado.

Sin embargo, dado el largo periodo de seguimiento, se pudieron obtener datos de recaída de las pacientes.

Los últimos 3 meses se dedicaron al análisis e interpretación de los datos y a la redacción del informe final de conclusiones.

#### **Primera Etapa:** Selección de las pacientes.

Tuvo lugar en las sesiones semanales de las Unidad Funcional de Patología Mamaria (UFPM). Fue el comité multidisciplinario el que seleccionó a las pacientes candidatas en base a los criterios de inclusión establecidos. La persona encargada de redactar el acta del comité tomó nota del caso o los casos clínicos comentados como posibles candidatos a entrar en el estudio y dejó esta decisión por escrito.

**Segunda Etapa (visita 1):** Inclusión en el estudio y obtención del consentimiento informado y extracción de la muestra.

Se llevó a cabo en la consulta externa de UFPM o de Oncología Médica. Se solicitó el consentimiento, una vez explicada su finalidad, para la inclusión en el estudio, así como para la realización de la técnica quirúrgica incluyendo la realización de la BSGC. Tras obtener el consentimiento, se constataron los datos personales (filiación) y los datos clínico-histológicos iniciales en la base de datos del estudio.

Fue en esta visita cuando se extrajo la muestra sanguínea para la determinación de VEGF-C que se manejó según lo estipulado en el ANEXO I.

**Tercera etapa (visita 2):** Intervención quirúrgica y obtención del resultado histopatológico definitivo.

En los plazos previstos tuvo lugar el tratamiento quirúrgico de la paciente que incluyó la BSGC por los equipos habituales. El estudio histopatológico se realizó de manera estandarizada por el servicio de Anatomía Patológica. El tipo final de intervención sobre la axila (BSGC exclusiva o BSGC + LA) y los datos histopatológicos definitivos se apuntaron en la base de datos del estudio, en el periodo posquirúrgico inmediato.

**Cuarta etapa:** Determinación de los niveles séricos de VEGF-C mediante inmunoensayo según las especificaciones del ANEXO I.

Esta fase se realizó en el Área de Biotecnología del Hospital Costa del Sol.

**Quinta etapa:** Análisis definitivo de todas las variables incluidas en la base de datos, valoración de resultados y extracción de conclusiones.

Todas las variables que analizar estuvieron disponibles, como máximo, a los 2 meses de la inclusión de la última paciente. Aunque no fue necesario un seguimiento prolongado para los objetivos del estudio, todas las pacientes fueron seguidas, al menos, durante 5 años, lo cual permitió el análisis de la supervivencia libre de enfermedad/recidiva.

Tabla 3.II. Etapas de estudio

Etapas	Meses																Año
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	5
Selección de las pacientes.																	
Análisis definitivo de todas las variables incluidas en la base de datos																	
redacción del trabajo																	
Publicación de los datos sin seguimiento																	
Publicación de datos con seguimiento																	

### 3.11 Valoración de la eficacia

#### 3.11.1 Determinaciones de laboratorio

Las pruebas de laboratorios se realizaron todas en el Área de Biotecnología del Hospital Costa de Sol

Los resultados de todas las pruebas de laboratorio exigidas por este protocolo fueron registrados en la base de datos del estudio (CRD).

Si las unidades del resultado de una prueba difieren de las impresas en el CRD, los valores de laboratorios registrados especificaron las unidades correctas.

Todas las determinaciones de laboratorio incluyeron las siguientes pruebas:

Hemograma  
Coagulograma  
Glucemia  
Creatinina  
Urea  
Test de gestación (si procedía)  
Perfil hepático

#### 3.12 Evaluaciones de seguridad

Se tuvieron en cuenta la seguridad del paciente en todo momento.

La seguridad y tolerancia a uso del colorante vital se cuantificó en función de la incidencia de acontecimientos adversos.

Se realizó el listado de verificación quirúrgica en el 100% de las intervenciones.

#### 3.13 Exploración física, constantes vitales

Durante la visita 1 se realizó la exploración clínica que incluyó la palpación mamaria y de las estaciones ganglionares. El diámetro tumoral se midió con regla o calibre.

En cara visita de seguimiento se realizó una exploración mamaria y física completa destinada a la búsqueda de recidivas loco-regionales o a distancia.

### **3.14 Otras pruebas complementarias**

Se realizó una radiografía de tórax al ingreso de la paciente al estudio.

Mamografía anual en seguimiento.

### **3.15 Incidencia de acontecimientos adversos**

Se decidió documentar y se notificar a la Unidad de Calidad a través de la herramienta “mistake” cualquier acontecimiento que cumpliera los criterios y definiciones de acontecimiento adverso (AA) o de acontecimiento adverso grave (AAG) según se establece en el presente protocolo.

Acontecimiento adverso (AA) es cualquier incidencia perjudicial para la salud en un paciente o sujeto de ensayo clínico tratado con un medicamento, aunque no tenga necesariamente relación causal con dicho tratamiento.

Reacción adversa (RA) es toda reacción nociva y no intencionada a un medicamento usado en la investigación, independientemente de la dosis administrada.

Acontecimiento adverso grave (AAG) es cualquier acontecimiento adverso que, a cualquier dosis, produzca la muerte, amenace la vida del sujeto, haga necesaria la hospitalización o la prolongación de ésta, produzca invalidez o incapacidad permanente o importante, o dé lugar a una anomalía o malformación congénita. A efectos de su notificación, se trataron también como graves aquellas sospechas de acontecimiento adverso que se consideraron importantes desde el punto de vista médico, aunque no cumplieran los criterios anteriores.

#### **3.15.1 Ética**

#### **3.15.2 Comité Ético (CEI local) y Autoridades**

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios que emanan de la Declaración de Helsinki, y según la normativa legal vigente (Real Decreto 223/2004), y contó con la aprobación del CEI del Hospital Costa del Sol.

#### **3.15.3 Consentimiento informado**

La paciente otorgó su consentimiento antes de ser admitida en el estudio clínico. El médico explicó la naturaleza, propósitos y posibles consecuencias del ensayo clínico, de una manera comprensible al paciente. La información proporcionada por el médico fue también registrada.

El sujeto del estudio otorgó su consentimiento firmando el modelo correspondiente. A este fin cada consentimiento llevó la firma del investigador y del paciente.

En el Anexo II se adjunta una copia del modelo de consentimiento informado.

#### **3.15.4 Confidencialidad**

Se dio estricto cumplimiento a los contenidos en la Ley Orgánica de protección de datos (15/1999)

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análisis descriptivo

Finamente fueron incluidas en el periodo de estudio septiembre 2009 a enero 2013 un total de 174 pacientes. 7 pacientes (4%) no fueron sometidas a la BSGC debido a problemas asociados con la técnica (no migración de trazador e imposibilidad de identificación del GC durante la intervención; recibiendo una LA asociada al tratamiento de tumor primario en la mama.

La edad media de las pacientes incluidas en el estudio fue de 57 años (32-79 años). Más de la mitad de las pacientes eran post menopáusicas en el momento del diagnóstico (66.1%), el tipo histológico más frecuente fue el carcinoma ductal infiltrante (78.7%)

La mayoría de los pacientes presentaban tumores considerados de buen pronóstico: diámetro tumoral menor de 2 cm y no LVSI, grado histológico I – II y presencia de receptores hormonales positivos.

En el 64.7% de los pacientes el factor Ki 67 fue mayor del 14% (Tabla 4.I)

Tabla 4.I. Características de la muestra.

Características de la muestra		
	Mean	
Edad	57 años	32-79
	N (174)	(% valido)
Estado menopausal		
- Post menopáusicas	115	(66.1)
- Pre menopáusicas	59	(33.9)
Tipo Histológico		
- Ductal	137	(78.7)
- Lobular	12	(6.9)
- Otro	25	(14.4)
TNM T		
- Tmic	3	(0.7)
- T1a	10	(3.5)
- T1b	35	(19.9)
- T1c	95	(58.2)
- T2	30	(17.7)
Grado histológico		
- Grado I	48	(27.9)
- Grado II	66	(38.4)
- Grado III	58	(33.7)
- Desconocido	2	
LVSI		
- SI	43	(24.9)
- No	130	(75.1)
- Desconocido	1	
Ki-67		
- 13% o menor	59	(35.3)
- Mayor de 13%	108	(64.7)
- Desconocido	6	

Receptores estrogénicos	96	
- RE positivos	33	(80.9)
- RE negativos	1	(19.1)
- Desconocidos		
HER2		
- Positivo	24	(14)
- Negativo	147	(86)
- Desconocido	3	
GC positivo		
- SI	64	(38.3)
- No	103	(61.7)
Linfadenectomía axilar		
- Si	46	(26.4)
- No	128	(73.6)

De las pacientes que fueron sometidas a BSGC, 63 pacientes (38,4%) presentaron uno o más GC comprometidos por la enfermedad (55% macrometastásicos, 28% micrometastásicos y 17% células tumorales aisladas) De media fueron recuperados 2 GC (rango inter cuartílico = 1)

De las 46 pacientes que fueron sometidos a LA, 39 presentaban un GC positivo. La media de ganglios linfáticos extraídos durante la linfadenectomía fue de 16.5 (rango intercuartílico = 11), con una media de 3.39 ganglios linfáticos comprometidos.

Se observó la presencia de NoGC positivos en 13 pacientes que fueron sometidas a LA y tenían previamente un GC positivo (34,3%). 12,5% de las pacientes presentaban además una invasión linfática ganglionar extracapsular.

Los niveles séricos de VEGF-C mostraron una distribución normal, con un valor de media de 6561.5 pg/ml (rango intercuartílico = 2121.3 pg/ml). No existieron diferencias significativas entre los niveles séricos de VEGF-C en mujeres sanas y aquellos encontrados en mujeres con cáncer de mama (media = 6125 pg/ml; rango intercuartílico 1907;  $p = 0.288$ ) (Tabla 4.II.)

Tabla 4.II. Valores séricos de VEGF-C en mujeres sanas

		Edad	VEGF-C
<b>N</b>	Válidos	21	21
	Perdidos	0	0
<b>Media</b>		41,38	6293,90
<b>Mediana</b>		41,00	<b>6125,00</b>
<b>Desv. típ.</b>		13,257	1576,752
<b>Mínimo</b>		24	3144
<b>Máximo</b>		70	9145



Percentiles	25	30,00	5320,00
	75	48,00	7227,50

## 4.2 Análisis bivariado / multivariable

El análisis bivariado mostró que el estado de compromiso del GC estuvo significativamente asociado con el tamaño tumoral determinado mediante ecografía ( $p=0.017$ ), con el tamaño final luego del estudio histopatológico ( $p=0.001$ ), con el grado histológico ( $p=0.004$ ) y con la presencia de LVSI ( $p<0.001$ ) (Tabla 4.III).

Tabla 4.III. Análisis Descriptivo y bivariado segmentando la población según el compromiso del GC.

	Total		Estado del GC					
			Negativo		Positivo		p	
	n	%	n= 104	%	n= 63	%		
Edad								
	Media (DE)	56.3	11.7	56.5	11.6	56.1	11.4	0.831
Tamaño tumoral patológico								
	Media (DE)	15.3	7.5	14.2	6.4	17.1	8.8	0.017
Grado Histológico								
	Grado I	46	27.9	38	36.9	8	12.9	0.004
	Grado II	63	38.2	34	33.0	29	46.8	
	Grado III	56	33.9	30	30.1	26	40.3	
LVSI								
	No	126	75,9	92	89.3	34	54.0	<0.001
	Si	40	24,1	11	10.7	29	46.0	
Plaquetas								
	Media (IC)	248000	64000	241500	62000	259000	73000	0,025
KI-67								
	Media (DE)	22.4	16.0	22.1	17.7	23.0	12.9	0.725
Receptor estrogeno								
	Negativo	32	19.3	22	21.4	10	15.9	0.505
	Positivo	134	80.7	81	78.6	53	84.1	
HER2 sobre expresión								
	Negativo	141	86	91	89.2	50	80.6	0.193
	Positivo	23	14	11	10.8	12	19.4	
VEGF-C								
	Mediana (RI)	6565	2241	6562	2192	6565	2259	0.626

RI = rango intercuartílico, DE = desviación estándar

No se observaron otras asociaciones significativas con otras variables como: edad, el estado menopáusico, la presencia de expresión de receptores hormonales, la sobreexpresión del Her 2 Neu, el subtipo histológico o el Ki 67.

Sin embargo, sí se ha encontrado una asociación significativa entre la presencia de compromiso del GC y el número total de plaquetas ( $p=0.025$ ).

No existió una correlación significativa entre los niveles séricos de VEGF-C y el compromiso del GC ( $p=0.626$ ) (Figura 4.1.) Es más, la media de los niveles séricos de VEGF-C de los pacientes con compromiso del GC fue ligeramente menor de aquellos sin él.

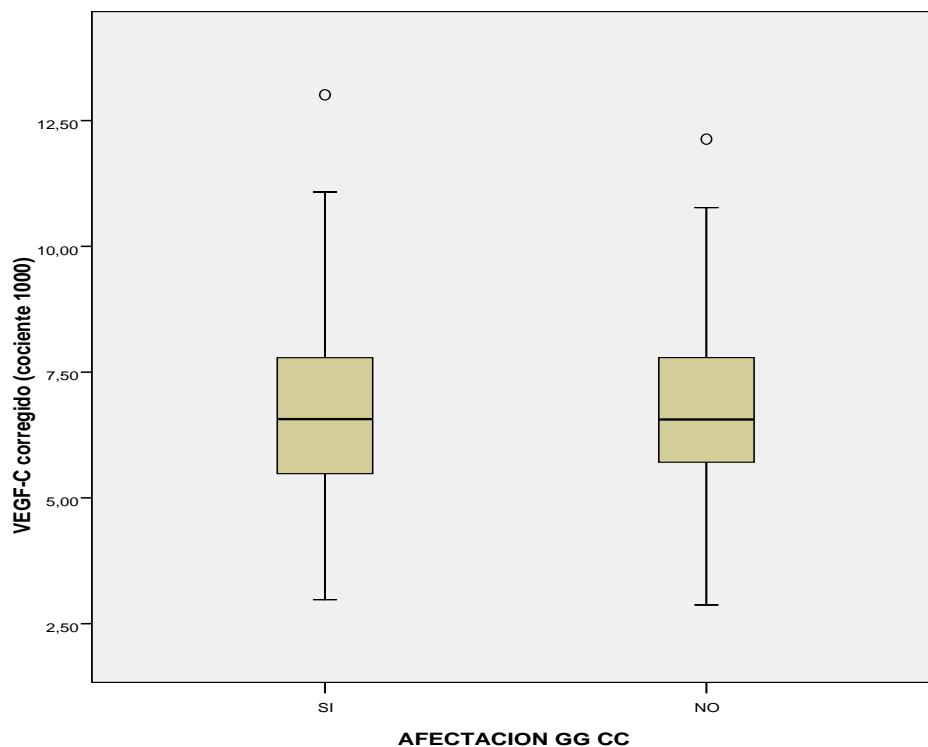


Figura 4.1. niveles séricos de VEGF-C y el compromiso del GC

Tampoco hubo asociación entre los niveles de VEGF-C y el número de ganglio linfáticos axilares afectados ( $p=0.146$ ), o entre los niveles séricos de VEGF-C y la presencia de ganglios axilares comprometidos en la linfadenectomía luego de la presencia de la GC positivo (No GC).

Los niveles séricos de VEGF-C no se asociaron con ninguna de las restantes variables clínicas o patológicas. Sin embargo, sí hubo una asociación entre los niveles séricos de VEGF-C y el número total de plaquetas ( $p=0.037$ ,  $r=0.158$ ).

En el análisis de regresión logística multivariante, solo el diámetro tumoral (OR: 0,96, IC95%: 0,94-0,98;  $p<0,001$ ) y la presencia de LVSI (OR: 5,35, IC95%: 2,39-11,97;  $p<0,001$ ) permanecieron estadísticamente significativos como predictores independientes de la afectación metastásica del GC.

### 4.3 Análisis de la supervivencia

Dado los valores séricos de VEGF-C (mediana 6561,5) se ha decidido para facilitar tanto el análisis como la exposición de resultados usar un cociente de 1000 para el tratamiento de estos (Figura 4.2, Tabla 4.IV.)

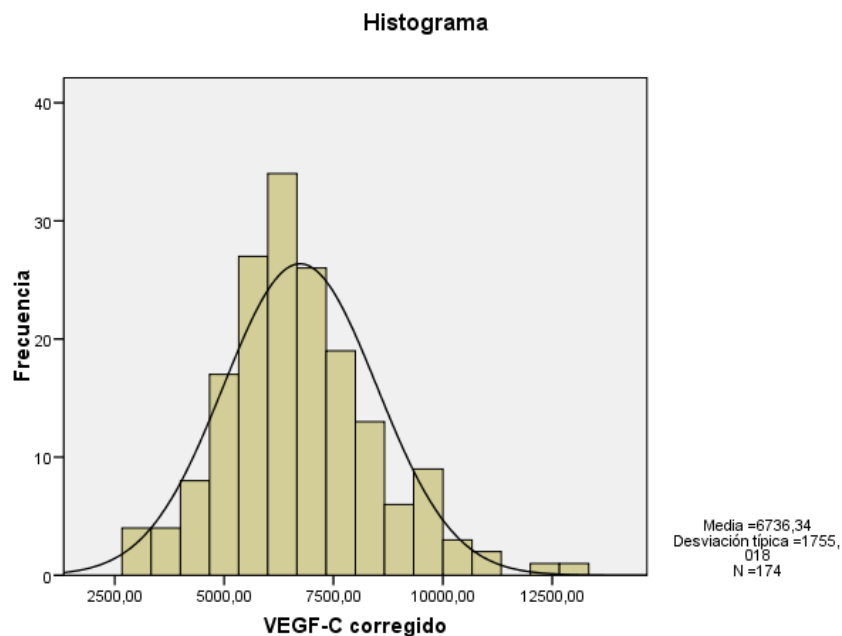


Figura 4.2. Distribución de valores séricos de VEGF-C

Tabla 4.IV. VEGF-C corregido (cociente 1000)

N	Válidos	174
	Perdidos	0
<b>Media</b>		6,7363
<b>Mediana</b>		<b>6,5615</b>
<b>Desv. típ.</b>		1,75502
<b>Mínimo</b>		2,87
<b>Máximo</b>		13,01
<b>Percentiles</b>	25	5,6194
	75	7,7438

De los 174 casos incluidos en el estudio, 3 casos se consideraron perdidos a efectos de seguimiento.

El tiempo hasta la recaída o hasta el último seguimiento tuvo una mediana de 51 meses (media de 49 meses), con una máxima de 80 meses (percentil 25: 42 mes, percentil 75: 62 meses) (Figura 4.3.) Durante este período de seguimiento se observaron 16 recaídas.

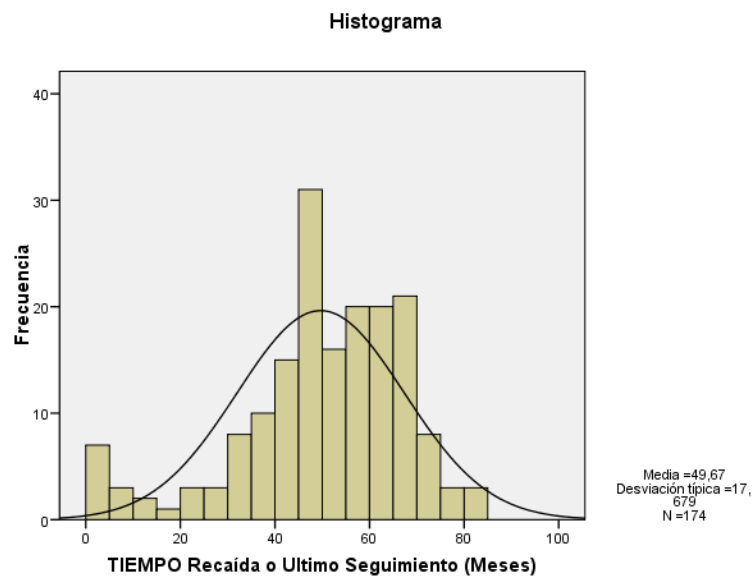


Figura 4.3. Tiempo hasta recaída.

Se obtuvieron las medianas de los valores séricos de VEGF-C tanto del grupo de pacientes que presentaron una recaída como de aquellas que no la había sufrido. (Tabla 4.V.)

Tabla 4.V. Frecuencias y distribución de los valores séricos de VEGF-C en paciente con y sin recaída.

RECAIDA			VEGF-C (cociente 1000)
<b>SI</b>	N	Válidos	16
		Perdidos	0
	Mediana		<b>6,0185</b>
	Percentiles	25	<b>4,9730</b>
		75	<b>6,6291</b>
<b>NO</b>	N	Válidos	155
		Perdidos	0
	Mediana		<b>6,6340</b>
	Percentiles	25	<b>5,6610</b>
		75	<b>7,9090</b>

Como primer análisis exploratorio se realizó un análisis de sobrevida libre de enfermedad mediante una regresión de Cox - Recaída y VEGF-C (cociente 1k), (Tabla 4-VI.)

Tabla 4.VI. Resumen del proceso de casos.

		N	Porcentaje
<b>Casos disponibles en el análisis</b>	Evento(a)	16	9,2%
	Censurado	155	89,1%
	Total	171	98,3%
<b>Casos excluidos</b>	Casos con valores perdidos	3	1,7%
	Casos con tiempo negativo	0	,0%
	Casos censurados antes del evento más temprano en un estrato	0	,0%
	Total	3	1,7%
Total		174	100,0%

a: Variable dependiente: TIEMPO Recaída o Ultimo Seguimiento (Meses)

Los valores séricos de VEGF-C muestran una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia libre de enfermedad ( $p=0.047$ ), comportándose una mayor elevación del factor VEGF-C como protector.

La reducción en 1000 puntos en los valores séricos de VEGF-C (1k) aumenta el riesgo instantáneo, tiendo un HR 1,357 (IC95%: 1,004-1,838). Este aumento de riesgo es del 35% por cada 1000 puntos de disminución de los valores séricos, evidenciable en el test de Kaplan-Meier. (Tabla 4.VII, Figura 4.4-5.)

Tabla 4.VII. Regresión de Cox - Recaída y VEGF-C (cociente 1k)

	Sig.	Hazard Ratio	95,0% IC para Exp(B)	
	Inferior	Superior	Inferior	Superior
<b>VEGF-C_1k</b>	<b>,047</b>	,737	,544	,996

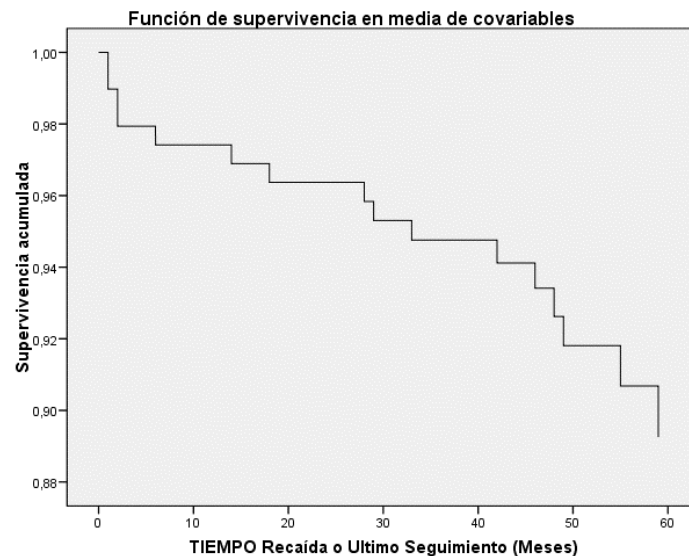


Figura 4.4. Función de supervivencia en media de covariables

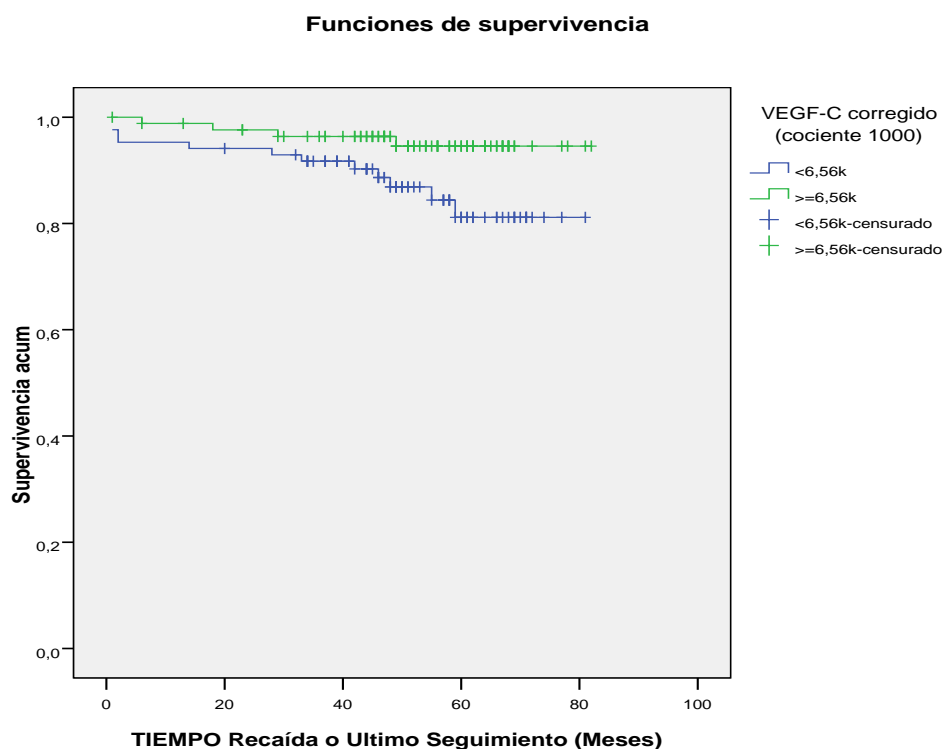


Figura 4.5. Test Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad

A continuación, y previo a la inclusión de variables en el análisis multivariable, se realizó un análisis bivariado utilizando los mismos factores pronósticos utilizados para valorar la significación estadística relacionada con la exposición a los mismos y el compromiso ganglios axilar, siendo en este caso la variable de agrupación la recaída de la enfermedad. (Tabla 4.VIII.)

Solo el grado histológico ( $p=0,039$ ) y el valor del Ki 67 ( $p=0,04$ ) resultaron significativamente asociados al tiempo libre de enfermedad o recaída.

Tabla 4. VIII. Análisis bivariado usando recaída como variable de agrupación

	Recaída		Valor estadístico p
	Si	No	
<b>Edad</b>	Mediana 53,5 años	Mediana 57 años	0.552 <sup>a</sup>
<b>Tamaño Tumoral</b>	Mediana 19,5 mm	Mediana 14 mm	0.125 <sup>a</sup>
<b>Grado histológico</b>			
Grado I	1 caso	46 casos	<b>0.039<sup>b</sup></b>
Grado II	7 casos	59 casos	
Grado III	8 casos	48 casos	
<b>LVS1</b>			
Presente	4 casos	39 casos	1 <sup>c</sup>
Ausente	12 casos	155 casos	
<b>Número de plaquetas</b>	Mediana 256000	Mediana 247000	0,362 <sup>a</sup>
<b>KI-67</b>	Mediana 24	Mediana 19	<b>0.04<sup>a</sup></b>
<b>Receptor estrogénico</b>			
Positivo	12 casos	129 casos	0.481 <sup>b</sup>
Negativo	4 casos	25 casos	
<b>Her 2 Neu</b>			
Positivo	3 casos	21 casos	0.705 <sup>b</sup>
Negativo	13 casos	131 casos	

a: prueba de Mann-Whitney

b: pruebas de chi-cuadrado

c: Estadístico exacto de Fisher

Bajo estas condiciones se ha realizado una regresión de Cox multivariante usando como variable resultado la recaída de la enfermedad y como variables independientes incluidas: VEGF-C 1k, Grado Histológico y Ki-67.

En el bloque de análisis inicial solo el KI-67 y el VEGF-C mantuvieron una significación estadística (tabla 4.IX.)

Tabla 4.IX. Regresión de Cox. Bloque inicial<sup>a</sup>.

	Puntuación	Sig.
<b>VEGF-C_1k</b>	4,000	<b>,046</b>
<b>GRD_HISTO</b>	4,358	,113
<b>GRD_HISTO(1)</b>	,092	,762
<b>GRD_HISTO(2)</b>	2,365	,124
<b>KI67</b>	5,427	<b>,020</b>

a Chi-cuadrado residual = 11,784 con 4 gl Sig. = ,019

A continuación, se realizó un segundo bloque de análisis mediante el método por pasos hacia adelante (RV condicional) (tabla 4.X.)

Al ajustar por valor de KI67, la reducción en 1000 puntos de VEGF-correctado (1k) aumenta el riesgo instantáneo de recaída en un 49%, con un HR 1,492 (IC95%: 1,084-2,061)



Tabla 4.X. Método por pasos hacia adelante

	<b>Sig.</b>	<b>Hazard Ratio</b>	<b>95,0% IC para Exp(B)</b>	
	Inferior	Superior	Inferior	Superior
<b>VEGF-C 1k</b>	,015	,670	<b>,485</b>	<b>,925</b>
<b>KI67</b>	,006	1,038	<b>1,011</b>	<b>1,066</b>

#### 4.4 Análisis por subtipos intrínsecos

Hemos explorado la relación entre los valores séricos de VEGF-C frente los diferentes subtipos intrínsecos de cáncer de mama con diferente biología tumoral.

La distribución de los diferentes subtipos mostró unas frecuencias compatibles con la reportada en la bibliografía actual (tabla4.XI.)

Tabla 4. XI. Fenotipos

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Porcentaje válido</b>	<b>Porcentaje acumulado</b>
<b>Válidos</b>	<b>Luminal A</b>	57	32,8	34,1	34,1
	<b>Luminal B</b>	68	39,1	40,7	74,9
	<b>Her 2</b>	10	5,7	6,0	80,8
	<b>Triple</b>	19	10,9	11,4	92,2
	<b>Negativo</b>	13	7,5	7,8	100,0
	<b>Luminal b Her</b>	167	96,0	100,0	
<b>Perdidos</b>	<b>Sistema</b>	7	4,0		
<b>Total</b>		174	100,0		

En el test de regresión de COX los valores los diferentes subtipos mantuvieron su impacto significativo respecto la función de supervivencia. Tabla 4.XII. Figura 4.6.

Tabla 4.XII. Descripción de las recaídas.

RECAIDA		Descripción 1º sitio de recaída	
TIPO RECAIDA	SISTEMICA	1	ósea
		2	ósea
		3	pleuopulmonar
		4	hepática
		5	mediastino, reroperitoneo, ósea
		6	hepática
		7	pulmonar
		8	ósea
		9	ósea, hepática
		10	hepática
		11	ósea, hepática, pulmonar
		12	ósea
		13	ósea
	LOCORREGIONAL	1	supraclavicular
		2	piel de mastectomía
		3	mama

**Función de supervivencia para modelos 1 - 5**

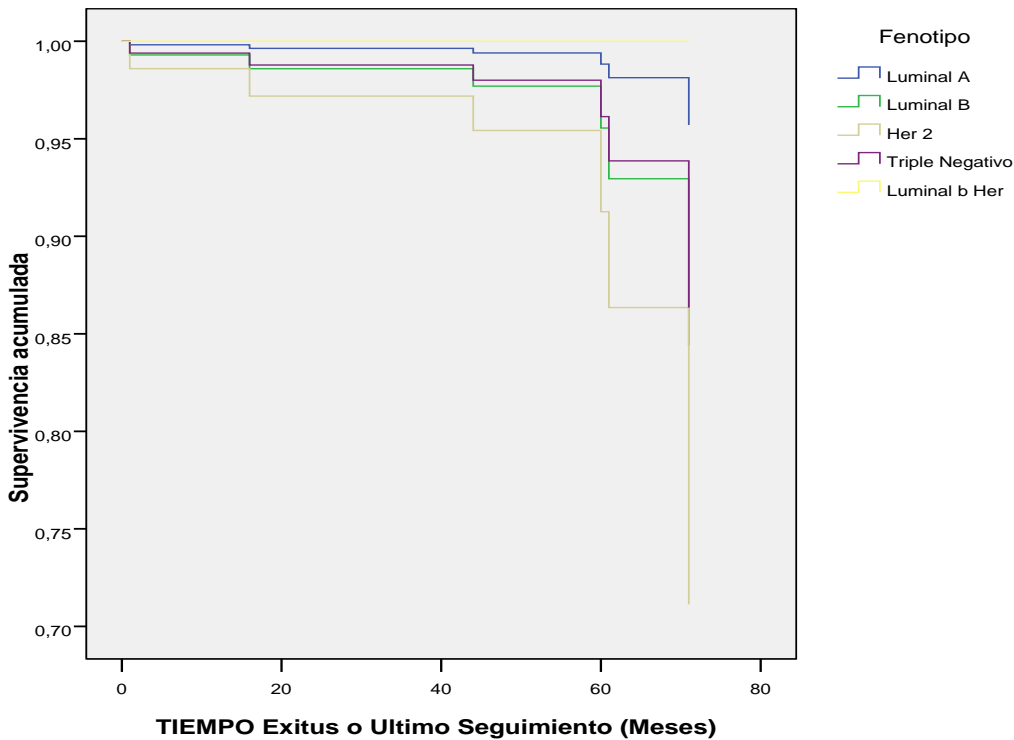


Figura 4.6. Subtipo intrínsecos y función de supervivencia.

En cambio, los valores séricos de VEGF (mediana) no fueron estadísticamente diferentes entre los subtipos intrínsecos. (prueba de Kruskal-Wallis  $p=0,932$ ) Tabla 4. XIII.

Para la clasificación de los subtipos intrínsecos se utilizó la expresión por inmunohistoquímica de los subtipos intrínsecos básicos: luminal A ([ER+|PR+] HER2-KI67-), luminal B ([ER+|PR+] HER2-KI67+), luminal B HER2+ ([ER+|PR+] HER2+KI67+), HER2 sobre expresado ([ER-PR-] HER2+), y triple negativo([ER+|PR+] HER2-)(115)

Tabla 4. XIII. Valores séricos de VEGF-C corregido (cociente 1000) en diferentes subtipos intrínsecos.

Subtipo Intrínseco	Estadístico	Valores
Luminal A	Mediana	6,4120
	Desv. Tip.	1,91569
Luminal B	Mediana	6,6435
	Desv. Tip.	1,80167
Her 2	Mediana	6,1757
	Desv. Tip.	1,80606
Triple Negativo	Mediana	6,6340
	Desv. Tip.	1,54578
Luminal b Her	Mediana	6,6010
	Desv. Tip.	1,53330

Realizado nuevamente un test de Cox, los niveles elevados de VEGF-C son un factor protector frente a la recaída al ajustar por fenotipo, con un Hazard Ratio de 0,72 (IC95%: 0,53-0,97) Tabla 4.XIV.

Tabla 4.XIV. Test de Cox Interacción VEGF y diferentes subtipos histológicos.

	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
	Inferior	Superior	Inferior	Superior
vegf_c_corr_1k	,036	,726	,539	,979
fenotipo	,655			
Nombre de variable fenotipo(1)	,218	2,308	,610	8,736
Nombre de variable fenotipo(2)	,160	3,609	,603	21,612
Nombre de variable fenotipo(3)	,287	2,658	,440	16,035
Nombre de variable fenotipo(4)	,626	1,763	,180	17,280

## 5 DISCUSIÓN

Hasta el presente, este es el primer trabajo prospectivo en evaluar los niveles séricos del factor linfangiogénico VEGF-C en relación con la afectación del GC y el pronóstico en cáncer de mama temprano (116).

El único antecedente es el estudio de Heer et al que en 2001 publicaron (117) un estudio prospectivo sobre 200 pacientes sometidas a cirugía del cáncer de mama, sin centrar el estudio específicamente sobre el VEGF-C, refiriéndose en forma genérica a la superfamilia VEGF en su totalidad.

El conocimiento de la afectación axilar en cáncer de mama sigue teniendo un importante valor pronóstico e influencia la elección del tratamiento adyuvante en estas pacientes (12) aunque solo un tercio presenten afectación ganglionar axilar. En los otros dos tercios, la decisión de administrar o no un tratamiento adyuvante está basado en otros factores pronósticos bien conocidos (edad, grado histológico, receptores hormonales, sobre expresión del gen HER 2 Neu).

Debido tanto a cuestiones relacionadas con la morbilidad del procedimiento BSGC, su coste como procedimiento quirúrgico, el tiempo quirúrgico y la complejidad de la técnica, en el pasado se ha realizado numerosos estudios para identificar factores predictivos de compromiso ganglionar axilar.

En el presente estudio fueron incluidas un total de 174 pacientes, tratadas de forma homogénea por el mismo equipo médico y quirúrgico de una Unidad Funcional de Patología Mamaria.

Las características epidemiológicas de esta cohorte son similares a otras muestras ya publicadas: 32% de los pacientes presentaban compromiso del GC y fueron sometidas a vaciamiento axilar, así mismo 58% no presentaron compromiso metastásico de ningún otro ganglio extirpado durante este procedimiento (118).

Recientemente, se han desarrollado diferentes nomogramas con la intención de predecir anticipadamente el compromiso axilar, tomando en cuenta diferentes variables clínico - patológicas.

En el presente estudio, fue realizado un subanálisis de los 174 pacientes incluidos en él.

Entre las variables analizadas, tanto el tamaño tumoral, el grado histológico como la presencia de LVSI han sido encontradas como factores predictivos, en forma

independiente, de la presencia de compromiso del GC. Estos datos son consistentes con otros trabajos publicados al respecto(118, 119).

Como ha sido ya publicado con anterioridad por otros autores, se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el número de plaquetas y la presencia de compromiso del GC (120).

En este sentido, Henk et al (104) estudiaron 19 pacientes con carcinoma de mama localmente avanzado y tratadas con quimioterapia dentro de un estudio fase II. Encontraron una alta correlación ( $r=0.8$ ;  $p<0.01$ ) entre los niveles séricos del VEGF y el recuento plaquetario. Comparando los valores de VEGF en suero y en plasma, encontraron que los niveles plasmáticos de VEGF fueron significativamente menores que los valores séricos ( $p<0.001$ ). En este estudio los autores demuestran que las plaquetas son los mayores transportadores fisiológicos de VEGF en sangre. Tanto en pacientes con cáncer de mama, como en mujeres sanas, las concentraciones séricas de VEGF están fuertemente relacionadas con el recuento plaquetario.

Byrne et al (102) no encontraron diferencias significativas entre los niveles de VEGF en plasma aclarado de plaquetas en 91 pacientes postmenopausicas con cáncer de mama temprano (T1 – T3) al ser comparadas con controles sanos (media = 142,4 pg/ml). Sin embargo si se encontraron diferencias significativas en los valores circulantes de VEGF en pacientes post menopaúsicas con cáncer de mama temprano (media = 157,1 pg/ml), respecto de los controles sanos (media = 38,1 pg/ml) ( $p<0,01$ ) No se encontraron diferencias en los valores séricos de VEGF entre diferentes grados tumorales, tamaño tumoral o el estado de compromiso ganglionar.

Otros autores, como Adams et al (100), han encontrado que la mejor forma de analizar las diferencias entre los valores séricos y plasmáticos de VEGF es utilizando plasma citratado. Este procedimiento permite una activación plaquetaria mínima. De todas formas, este tratamiento podría no ser un discriminante certero debido al considerable solapamiento de los valores encontrados entre pacientes sanos y afectados de carcinoma de mama temprano.

Sin embargo, en este trabajo de tesis, la consideración en forma conjunta del recuento de plaquetas y de otros factores no fue suficiente como para permitirnos crear una puntuación que pueda ser usada antes de la cirugía del cáncer de mama para predecir el estado ganglionar axilar. Es posible que la contaminación plaquetaria que sigue en

forma rutinaria al acceso venoso no permita una valoración correcta de los valores séricos de VEGF-C.

Muchos estudios han ya destacado la importancia del VEGF-C, del VEGF-D y de su receptor VEGFR3 en la linfagiogénesis. El papel del VEGF-C en la diseminación linfática ha sido establecido mediante experimentos en modelos animales (ratones) en los cuales la administración de RNAi anti VEGF-C redujo significativamente el riesgo de metástasis ganglionares(82).

Teniendo en cuenta estos resultados y en ausencia de otros estudios publicados que evalúen exclusivamente los niveles séricos de VEGF-C como factor predictivo del compromiso axilar en cáncer de mama, se ha examinado esa posibilidad mediante el uso de ELISA. Luego de las cuantificaciones de las muestras, el análisis no ha mostrado una relación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de VEGF-C y el estado axilar ya sea luego de una GC o de un vaciamiento axilar.

La expresión del VEGF-C en pacientes con cáncer de mama fue investigada por primera vez en un estudio de casos y controles por Al-Mowallad et al (121) . En este estudio los niveles séricos de VEGF-C de 122 pacientes con cáncer y 64 controles fueron analizadas usando ELISA. No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos entre los pacientes con cáncer y los controles; aunque los niveles séricos de VEGF-C fueron más altos en casos de carcinoma de mama inflamatorio, nuevamente en forma no significativa.

Subsecuentemente, Gisterek et al (122) analizaron las muestras de suero de 377 pacientes con cáncer de mama y controles sanos para determinar los niveles séricos de VEGF-A, VEGF-D y VEGF-C. En este estudio no se encontraron diferencias, en los niveles séricos de los tres factores, entre pacientes con cáncer de mama y aquellos sanos.

Stathopoulos et al (106) analizaron los niveles plasmáticos de VEGF usando la técnica cuantitativa de inmunoensayo (quantikine). 93 pacientes con cáncer de mama fueron incluidas en el ensayo; 46 pacientes sin evidencia de recurrencia y 47 pacientes con enfermedad metastásica. No encontraron diferencias estadísticas entre los dos grupos. En los individuos sin evidencia de enfermedad los niveles en plasma de VEGF fluctuaron en forma similar a los pacientes con evidencia de recaída, entre valores de 5-680 pg/ml. Sus resultados mostraron que los niveles plasmáticos de VEGF varían extensivamente indicando que no es un biomarcador con valor pronóstico o predictivo.

En contraste, otros estudios sobre pacientes con cáncer de mama han intentado demostrar la relación entre la expresión tisular de factores relacionados con la linfangiogénesis y el riesgo de metástasis linfonodales (77, 96). Mediante inmunohistoquímica de las piezas quirúrgicas del tumor primario, estos estudios encontraron que un aumento de la expresión del VEGF-C estaba relacionado con un aumento de la densidad peritumoral de los capilares linfáticos y del riesgo de metástasis ganglionares.

Como se ha mencionado al iniciar esta discusión, Heer et al (117) publicaron en el año 2001, un trabajo de diseño y muestra similar al nuestro; aunque centrándose en la totalidad de la súper familia VEGF (posiblemente se trate de VEGF-A que era el principalmente detectado por los test de inmunoensayo en la época de publicación del trabajo de Heer). Los autores analizaron los valores séricos de 200 pacientes con cáncer de mama y de 88 controles sanos. Los niveles séricos de VEGF de los pacientes con cáncer de mama estuvieron significativamente elevados respecto a los controles sanos (305,9 pg/ml;  $p < 0,0005$ ). Los pacientes afectados de un carcinoma ductal NOS mostraron una media de los valores séricos de VEGF significativamente elevada respecto a los controles sanos. Sorprendentemente los casos de carcinoma ductal in situ presentaban valores séricos significativamente elevados no solo si se comparaban con los controles sanos, sino también al compararlos con los casos de carcinoma lobular o ductal invasor (487,8 pg/ml;  $p = 0,001$ ). También los niveles de VEGF sérico de los estadios IV estuvieron elevados en forma significativa respecto a aquellos de los estadios I-III. Por el contrario, el compromiso linfonodal no se vio influenciado por los niveles séricos de VEGF.

En un estudio realizado sobre 116 pacientes operables y diagnosticados de carcinoma de pulmón no células pequeñas, los niveles séricos de VEGF-C debajo de 1850 pg/ml fueron capaces de predecir, con una especificidad del 77%, la negatividad del compromiso ganglionar mediastino en las muestras obtenidas de la linfadenectomía hiliar. Esta especificidad aumenta hasta el 80 % cuando el nivel de VEGF-C se combina con los resultados de la tomografía computarizada (123).

El estudio de Morgillo et al (124) encontró, en un grupo de pacientes con cáncer de mama con receptores hormonales positivos, que los niveles séricos de VEGF-C eran mayores entre pacientes con cáncer de mama y compromiso linfonodal que en pacientes sin esta afectación.



En el mismo año, Thielemann et al analizaron las concentraciones séricas de VEGF en 130 pacientes con cáncer de mama y en 40 mujeres sanas. Las medias de los valores serológicos de VEGF de los pacientes con cáncer de mama fue 6 veces mayor que la encontrada en el plasma de mujeres sanas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. El estudio muestra así mismo una considerable elevación de los valores séricos en pacientes con compromiso axilar (125).

Rocca et al (101) analizaron los valores séricos de VEGF en pacientes con cáncer de mama T1–T2 y N0-2. Las concentraciones de VEGF fueron determinadas mediante inmunoensayo enzimático cuantitativo tipo sándwich (Quantikine Human VEGF), y sus concentraciones reportadas en pg/ml. Fueron obtenidas muestras de 124 pacientes, con una media de edad de 49 años. La mayoría de las pacientes presentaban un T1 (55%) y un 58% presentaban compromiso axilar (un porcentaje de afectación axilar mucho mayor que en nuestra serie). Todas las pacientes fueron sometidas a una BSGC. El valor medio preoperatorio de VEGF fue de 341.73 pg/ml, con un aumento a 346,84 pg/ml el día posterior a la cirugía. Ninguno de los dos niveles, pre o post operatorio, fue asociado con algunos de los parámetros clínico-patológicos estudiados (edad, tamaño tumoral, estado linfonodal, receptores hormonales, Ki 67, Her 2 Neu o invasión perivascular). Igualmente, los valores séricos preoperatorios de VEGF no estuvieron asociados con la SLE.

En nuestro estudio, ninguna de las diferentes variables pronosticas consideradas estuvo significativamente relacionada con los valores séricos de VEGF-C. Sin embargo, como lo he reseñado anteriormente, hemos encontrado una asociación entre el número de plaquetas y el compromiso linfonodal, y una asociación estadísticamente significativa entre los valores séricos del VEGF y el recuento plaquetario.

Estudios sobre otro tipo de tumores sólidos también han demostrado una relación estadísticamente significativa entre la presencia de extensión hacia los ganglios linfáticos y los elevados niveles séricos de VEGF-C en pacientes con tumores como el de no pequeñas células de pulmón, cáncer de colon, gástrico y de esófago (126-128)

Igualmente, estudios sobre otros tipos de tumores han analizado la relación entre los niveles séricos de VEGF-C comparados con población de pacientes sanos, así como con la evolución o el estadio tumoral.

Al-Moundhri et al (129) evaluaron los niveles séricos del VEGF-C en 76 pacientes con carcinoma gástrico y en 76 pacientes sanos. Es interesante que los niveles de VEGF-C fueron mayores en los controles que en pacientes afectados de carcinoma gástrico. Sin embargo los valores séricos de VEGF-C sí estuvieron asociados en tumores con estadios más avanzados y con presencia de metástasis.

Kimura et al (130) valoraron los niveles séricos de VEGF-C preoperatorios en 80 pacientes con cáncer de esófago. Los valores preoperatorios fueron de 5680  $\pm$  2891 pg/ml, los cuales fueron significativamente más altos que el nivel encontrado en voluntarios sanos (4819 $\pm$ 1255 pg/ml). Los niveles séricos de VEGF-C estuvieron asociados con la presencia de metástasis ganglionares regionales ( $p=0,0068$ ), la presencia de invasión linfática ( $p=0,0081$ ) y la presencia de invasión vascular ( $p=0,0219$ ); no encontrándose asociación con factores como edad, género, localización, grado histológico o el tipo histológico. La SG y la SLE fueron menores en aquellos pacientes con niveles mayores de VEGF-C en suero ( $p=0,00183$ ) – punto de corte 5680 pg/ml.

Algunos autores han estudiado el impacto de los valores séricos de VEGF-C en carcinomas de origen ginecológico. Cheng et al (131) analizaron los valores de VEGF-C en muestras séricas de 109 pacientes con cáncer de ovario obtenidos antes de la cirugía. Los valores séricos de VEGF-C fueron significativamente más altos en paciente con cáncer de ovario que en aquellas con tumores benignos o controles sanos ( $p=0,01$ ). En relación con las variables clínicopatológicas, los niveles séricos de VEGF-C mostraron una correlación significativa con el estadio FIGO de la enfermedad ( $p=0,04$ ), así como en pacientes con metástasis ganglionares ( $p=0,01$ ). Además, los valores de VEGF-C fueron mayores en los pacientes con tumores no resecables ( $p=0,013$ ) o que fallecieron durante el período de seguimiento. Pacientes con valores elevados de VEGF-C ( $>10200$  pg/ml) tuvieron una supervivencia significativamente más corta. Los valores de VEGF-C afectaron en forma significativa la SG tanto en el análisis univariante como en el multivariante ( $p=0,01$ ).

Dobrzycka et al (132) analizaron los valores séricos de VEGF-C (Quantikine) de 98 pacientes con cáncer de endometrio. 76 casos fueron carcinomas tipo I (endometrioides), y 22 casos fueron carcinomas tipo II (19 casos carcinoma seroso, 3 células claras). Los valores séricos de VEGF-C estuvieron significativamente elevados respecto a los controles sanos, tanto el carcinoma de tipo I como en los de tipo II. También se encontraron diferencias entre los valores séricos de los dos tipos de tumores

examinados: 5.120,1 pg/ml en los carcinomas tipo I y 7213,2 pg/ml en aquellos tipos II. Los valores séricos se correlacionaron en forma significativa con el estadio FIGO de la enfermedad en los carcinomas tipo II avanzados ( $p < 0,001$ ). Por el contrario, no se correlacionaron con el estadio FIGO en los carcinomas tipo I.

Es interesante resaltar que los carcinomas endometriales tipo I en pacientes con niveles séricos bajos de VEGF-C (5.120,1 pg/ml o menores) tuvieron una SG a 10 años del 88,6%, en comparación con aquellos con niveles séricos de más de 5.120,1 pg/ml (SG 94%), aunque estas diferencias no fueron significativas. Por el contrario, en los pacientes portadores de un carcinoma tipo II la supervivencia a 10 años fue de 0% para aquellos con niveles séricos altos ( $> 7.213,2$  pg/ml), mientras que aquellos pacientes con bajos niveles séricos ( $< 7.213,2$  pg/ml) tuvieron una SG a 10 años del 50% (long Rank test ;  $p = 0,0197$ )

El hecho de que solo los tumores tipo I no muestren niveles elevados de VEGF-C en enfermedad avanzada, pero sí que los tipo II muestren valores significativamente elevados sugiere que la biología tumoral, más que la linfangiogénesis, puede influenciar la capacidad invasora local, y solo mostrar valores elevados en casos de carcinomas tipo I en estadios avanzados.

Zhang et al (133) valoraron 66 pacientes sometidos a cirugía por un tumor primario de pulmón no células pequeñas. La mediana de los valores en suero de VEGF-C en los pacientes con cáncer de pulmón fue de 655,7 pg/ml. Los pacientes con metástasis ganglionares mostraron niveles séricos mayores que los pacientes sin afectación ganglionar ( $p = 0,026$ ). Similarmente se observaron diferencias entre los valores séricos de los diferentes estadios.

Recientemente, Sun et al (134) analizaron los valores séricos de VEGF-C en 153 pacientes con carcinomas nasofaríngeos y 148 adultos sanos. La expresión del VEGF-C fue de 473,25 pg/ml en pacientes portadores de carcinoma y de 225,42 pg/ml en pacientes sanos. También el estadio TNM estuvo significativamente relacionado con los niveles séricos de VEGF-C ( $p < 0,05$ ). Sorprendentemente los niveles de VEGF-G aumentaron al aumentar el estadio TNM, pero disminuyeron en pacientes con estadio IV.

De la misma forma Benoit et al (135) analizaron los valores séricos de VEGF-C en 71 pacientes con carcinoma de vejiga. Los valores séricos de VEGF-C estuvieron elevados en el suero de pacientes con carcinoma urotelial de vejiga, en comparación con pacientes con carcinoma de vejiga no invasor o pacientes sanos. Sin embargo, este marcador no tubo valor pronóstico.

En cuanto la relación entre de los valores séricos de VEGF y la SLE, el presente trabajo es uno de los escasos publicados al respecto; y probablemente el prospectivo más extenso. En este trabajo de tesis se ha encontrado que los valores séricos de VEGF-C mostraron una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia libre de enfermedad ( $p=0.047$ ), comportándose la exposición al factor VEGF-C como protector. La reducción en 1000 puntos en los valores séricos de VEGF-C (1k) aumenta el riesgo instantáneo, dando un HR 1,357 (IC95%: 1,004-1,838). Este aumento de riesgo es del 35% por cada 1000 puntos de disminución de los valores séricos.

Iguals resultados obtuvieron Rueda et al (111) en un grupo de pacientes 88 portadores de Linfomas difusos de células grandes B. Los pacientes con altos niveles séricos de VEGF-C basales tuvieron una SG y una SLE a 4 años mejor que aquella de pacientes con bajos niveles de VEGF-C. La mayor diferencia se encontró en pacientes con niveles séricos de VEGF-C superiores al tercer cuartil ( $>5755$  pg/ml). Estos pacientes tuvieron un SLE a 4 años del 80% y una SG a 4 años del 95%, mientras que los pacientes debajo del tercer cuartil tuvieron un SLE del 53% y una SG a 4 años del 68% ( $p<0,04$  para SLE, y  $p<0,02$  para SG).

Un grupo liderado por el mismo autor anterior (136), investigó el rol del VEGF-C esta vez en 54 pacientes con linfoma de Hodgkin. En pacientes con niveles séricos de VEGF-C debajo del valor de la media ( $>7675$  pg/ml) la SLE fue menor que en pacientes con niveles sobre el nivel medio (66,7% vs 88,5%; Mantel Cox  $p=0,064$ ), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Tomando como ejemplo el comportamiento de los valores séricos de VEGF en el carcinoma de endometrio de tipo I, donde los valores de VEGF en suero se comportaron como factor protector, es posible trasladar esta interesante analogía con los diferentes subtipo intrínseco de carcinoma de mama.

Existe al parecer solo una publicación al respecto, pero que evalúa la relación los valores de VEGF (sin distinguir entre miembros de la misma familia) y utilizando inmunohistoquímica (no valores séricos). De todas formas, el trabajo de Liu et al (137) plantea un interrogante similar al del presente trabajo en cuanto al comportamiento protector en cuanto a SG de altos niveles de VEGF.

Estos Autores analizaron muestras histológicas de pacientes con cáncer tratadas en el NHS entre los años 1969 – 1996. Se obtuvieron 3752 muestras histológicas determinándose los niveles VEGF en 2268 casos, de los cuales 1947 casos

correspondieron a carcinomas de mama estadios I-III. Finalmente fueron incluidos en el análisis 1788 casos.

La expresión de VEGF fue más comúnmente detectada en los fenotipos luminal B, HER2, y basal (triple negativo). La positividad para VEGF se asoció significativamente con un aumento en la mortalidad específica por cáncer de mama (HR= 1,52, 95% CI=1,19-1,95) y con las recurrencias a distancia (HR=1,52,95% CI=1,17-1,96).

Al analizar la correlación entre los niveles de VEGF y los diferentes subtipos intrínsecos, la asociación entre VEGF y la sobrevida fue significativamente diferente entre los diferentes subtipos (p para interacción = 0,02 tanto para mortalidad específica por cáncer de mama como para mortalidad global). El análisis multivariado mostró que la positividad para VEGF estuvo significativamente asociada con un aumento de la mortalidad específica (HR=1,41) y las recurrencias (HR:1,49). Aunque la positividad para VEGF no afectó en forma significativa los resultados en pacientes con tumores luminal B, HER y triple negativo tanto en términos de mortalidad específica como de recurrencias (HR=0,50, 95% CI=0,27-0,95).

Sorprendentemente, luego de ajustar el modelo de acuerdo con los tratamientos adyuvantes recibidos, los autores encontraron una relación inversa ente los niveles de VEGF y la mortalidad específica por cáncer de mama en aquellos tumores triples negativos.

En este trabajo de tesis, los valores séricos de VEGF se mantuvieron como factor protector en forma independiente del subtipo intrínseco.

El presenta trabajo de tesis es el primero en analizar prospectivamente el impacto de los niveles séricos de VEGF-C sobre la afectación ganglionar axilar en cáncer de mama temprano sometido a BSGC. Desafortunadamente, la hipótesis de partida no ha podido ser confirmada con los resultados del estudio. Estos no son concordantes con los observados en la mayoría de los estudios comentados, lo que puede deberse a varios factores: el carácter retrospectivo de la mayoría de los estudios, el estudio de VEGF-C en suero versus tejido (podría tener implicaciones biológicas diferentes), la diferente metodología utilizada en la determinación de VEGF-C y las diferencias en la población a estudio. En concreto, el presente trabajo de tesis incluye mujeres con cáncer de mama temprano (un porcentaje significativo diagnosticado mediante campaña de cribado) que podría tener una biología diferente que las pacientes incluidas en los estudios comentados en la discusión (138)

Por otro lado, la relación entre niveles séricos elevados de VEGF-C y mejor supervivencia libre de progresión que parecen sugerir los resultados de nuestro estudio

debe ser interpretada con cautela (puede deberse a una distribución de covariables no valoradas o analizadas en el presente trabajo, al insuficiente tamaño muestral para valorar la SLE o al insuficiente seguimiento para el evento recaída, sobre todo para las pacientes de fenotipo luminal). No obstante, el hecho de que niveles séricos altos de VEGF-C puedan conllevar mejor pronóstico en diferentes neoplasias que coinciden en que la primera estación de diseminación de la enfermedad a nivel clínico y patológico es el ganglio linfático (cáncer de mama temprano, cáncer de endometrio tipo I, linfomas B), merece profundizar en esta línea de investigación. Una explicación de este fenómeno podría basarse en que las pacientes con neoplasias con mecanismos biológicos ineficientes para la proliferación linfonodal (por tanto, con mejor pronóstico) podría presentar niveles séricos elevados de VEGF-C como mecanismo de rebote. La demostración de esta hipótesis requeriría otros diseños y abordajes diferentes en proyectos de investigación prospectivos.

## 6 CONCLUSIONES

1º.- Los niveles séricos de VEGF-C no están relacionados con el riesgo de afectación ganglionar axilar en cáncer de mama temprano y, por tanto, no pueden utilizarse para predecir la presencia de afectación ganglionar en la BSGC.

2º.- En nuestra serie los factores clínico-patológicos relacionados con el riesgo de afectación ganglionar axilar en cáncer de mama temprano son el tamaño tumoral y la presencia de invasión linfovascular.

3º.- Los niveles séricos de VEGF-C no están relacionados con ningún factor clínico-patológico clásico en cáncer de mama temprano.

4º.- Las pacientes con niveles séricos de VEGF-C por encima de la media presentan menor riesgo de recaer en los primeros 4 años de seguimiento que las pacientes con valores por debajo de la media. Esta diferencia fue estadísticamente significativa en el análisis multivariado por lo que merece confirmación en futuros estudios diseñados específicamente para este objetivo.

## **7 Anexo I.**

### **INMUNOENSAYO VEGF-C EN SUERO HUMANO**

#### Principio del ensayo

El ensayo VEGF-C de QUANTIKINE (R&D), es un inmunoensayo tipo sándwich que utiliza un anticuerpo monoclonal específico para VEGF-C, que se encuentra recubriendo la superficie de una microplaca, de manera que las moléculas de VEGF-C presente en el suero se unen al anticuerpo inmovilizado. Después de sucesivos lavados, para eliminar las sustancias no unidas, se agrega a los pocillos un anticuerpo policlonal específico para VEGF-C marcado con enzima. Después de otro lavado, se determina la concentración de VEGF-C mediante la incubación con el sustrato. Por último, se añade la solución de parada, que finaliza la reacción, produciendo un producto final coloreado. La cantidad de conjugado fijado se mide en unidades de absorbancia a 540 o 570 nm (Zenit SP+ Menarini). La concentración de VEGF-C puede calcularse por interpolación a partir de curvas de calibración de los estándares.

#### Medida de absorbancia

Para la medida de absorbancia se utiliza el analizador ZENIT SP + (Menarini), que es un sistema abierto para procesar test inmunoenzimáticos con técnica de ELISA en microplaca 8x12. Cumple con los requisitos de la directiva 98/79/EC de dispositivos médicos para diagnósticos *in vitro*.

#### Cálculo de los resultados

Para el cálculo de los resultados hay que hacer un promedio de las lecturas duplicados para cada estándar, control, y muestra y restar la densidad óptica estándar cero medias. Se debe trazar la densidad óptica contra la concentración de los estándares, y dibujar la mejor curva. Para determinar la concentración de VEGF-C de cada muestra, deben interpolarse los datos de densidad óptica en la curva estándar. Si se han diluido las muestras, la concentración leída en la curva estándar se debe multiplicar por el factor de dilución.

#### Recolección y almacenamiento de muestras

El tipo de muestra recomendado para este ensayo es suero (Tubo sin aditivo y gel separador. Tapón amarillo). Los tubos deben mantenerse siempre tapados y en posición vertical. Las muestras deben coagular adecuadamente antes de la centrifugación. Se centrifugarán 15 minutos a 1000g. A continuación, debe separarse el suero en varias alícuotas. Si las muestras no se analizan en el transcurso de 48 horas, deben congelarse a una temperatura inferior o igual a -20 °C

#### Precisión

Precisión Intra-ensayo (precisión dentro de un análisis), determinada utilizando tres muestras de concentración conocida, medidas veinte veces seguidas cada una. CV(%):

3.5-6.6

Precisión Inter-ensayo (precisión entre análisis), determinada utilizando tres muestras de concentración conocida, medidas cuarenta veces cada una, en distintos días. CV(%):

6.4-8.5%.

#### Sensibilidad y rango de ensayo

El ensayo VEGF-C de QUANTIKINE mide concentraciones de VEGF-C de hasta 7000 pg/ml con una concentración mínima detectable (sensibilidad analítica) de 13.3 pg/ml.

La sensibilidad analítica se define como la concentración de VEGF-C que corresponde al valor de absorbancia de dos desviaciones estándar mayor que la media de absorbancia de 20 determinaciones repetidas del estándar cero.

#### Especificidad

No hay reactantes cruzados conocidos para VEGF-C.

Se analizó la posible interferencia con más de 60 factores recombinantes, añadiendo estas sustancias a mezclas de suero que contenían niveles de VEGF-C de 50 ng/ml.



## **8 Anexo II**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE**

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

#### **Naturaleza:**

Le proponemos participar en un estudio de investigación. Para ello necesitamos que usted nos done una muestra de sangre obtenida antes de su intervención quirúrgica. Posteriormente esta muestra será analizada en el laboratorio para determinar los niveles de la proteína VEGF-C en su suero.

La proteína VEGF-C actúa en el tumor favoreciendo la invasión de los ganglios linfáticos por parte de las células malignas. El objetivo de esta investigación es intentar conocer si los niveles de VEGF-C en suero están relacionados con la afectación de los ganglios linfáticos de la axila por el cáncer de mama.

#### **Importancia:**

La participación en este estudio no conlleva ningún beneficio para usted. Sin embargo, si la investigación tuviera éxito podría ayudar en el futuro a pacientes que tienen la misma enfermedad que usted u otras enfermedades similares. Concretamente el éxito de esta investigación podría ayudar a evitar la realización de la pequeña intervención quirúrgica sobre la axila (técnica del ganglio centinela) a la que usted va a ser sometida.

#### **Implicaciones para el donante/paciente:**

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

#### **Riesgos de la investigación para el donante/paciente:**

La participación en esta investigación sólo supone la extracción de una muestra sanguínea de una vena del brazo. Los riesgos previstos son mínimos y leves pero pueden aparecer los siguientes:

- Dolor o inflamación leve en la zona de la punción venosa.
- Aparición de un pequeño hematoma o hemorragia en el punto de la punción venosa.

Si requiere información adicional se puede ponerse en contacto la SECRETARIA DE GINECOLOGIA, 3ª planta, Hospital Costa del Sol.- Marbella.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

< Relación entre los niveles séricos del factor de crecimiento endotelial-vascular C (VEGF-C) y la afectación ganglionar axilar en pacientes con Cáncer de Mama Operable sometidas a biopsia selectiva del ganglio centinela.>

Yo ..... (Nombre ..... y Apellidos):.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio <Relación entre los niveles séricos del factor de crecimiento endotelial-vascular C (VEGF-C) y la afectación ganglionar axilar en pacientes con Cáncer de Mama Operable sometidas a biopsia selectiva del ganglio centinela>
- He recibido suficiente información sobre el estudio <Relación entre los niveles séricos del factor de crecimiento endotelial-vascular C (VEGF-C) y la afectación ganglionar axilar en pacientes con Cáncer de Mama Operable sometidas a biopsia selectiva del ganglio centinela> He hablado con el profesional sanitario informador: .....
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si

No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado* <Relación entre los niveles séricos del factor de crecimiento endotelial-vascular C (VEGF-C) y la afectación ganglionar axilar en pacientes con Cáncer de Mama Operable sometidas a biopsia selectiva del ganglio centinela>

Firma del paciente

(o representante legal en su caso)

Firma del profesional

sanitario informador

Nombre y apellidos:.....

Fecha: .....

Nombre y apellidos: .....

Fecha: .....

## 9 BIBLIOGRAFÍA

1. Fisher B, Anderson SJ. The breast cancer alternative hypothesis: is there evidence to justify replacing it? *J Clin Oncol*. 2010;28(3):366-74.
2. Hellman S. Karnofsky Memorial Lecture. Natural history of small breast cancers. *J Clin Oncol*. 1994;12(10):2229-34.
3. Rabinovitch R, Kavanagh B. Double Helix of breast cancer therapy: intertwining the Halsted and Fisher hypotheses. *J Clin Oncol*. 2009;27(15):2422-3.
4. McGuire WL, Donegan WL, Fisher B, Hayward JL. Optimal surgical approaches to the local management of early breast cancer. A panel discussion. *Breast Cancer Res Treat*. 1985;6(2):101-12.
5. Fisher B, Anderson S, Fisher ER, Redmond C, Wickerham DL, Wolmark N, et al. Significance of ipsilateral breast tumour recurrence after lumpectomy. *Lancet*. 1991;338(8763):327-31.
6. Fisher B, Jeong JH, Anderson S, Bryant J, Fisher ER, Wolmark N. Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *N Engl J Med*. 2002;347(8):567-75.
7. Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 2000;355(9217):1757-70.
8. Mayer EL, Dominici LS. Breast cancer axillary staging: much ado about micrometastatic disease. *J Clin Oncol*. 2015;33(10):1095-7.
9. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736-47.
10. Staaf J, Ringnér M. Making breast cancer molecular subtypes robust? *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(1):386.
11. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(6):546-53.
12. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, Benson AB, Bodurka DC, Burstein HJ, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7703-20.
13. Lyman GH, Temin S, Edge SB, Newman LA, Turner RR, Weaver DL, et al. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2014;32(13):1365-83.
14. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(16):1233-41.
15. Veronesi U, Salvadori B, Luini A, Banfi A, Zucali R, Del Vecchio M, et al. Conservative treatment of early breast cancer. Long-term results of 1232 cases treated with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy. *Ann Surg*. 1990;211(3):250-9.
16. Rao R, Euhus D, Mayo HG, Balch C. Axillary node interventions in breast cancer: a systematic review. *JAMA*. 2013;310(13):1385-94.
17. Fleissig A, Fallowfield LJ, Langridge CI, Johnson L, Newcombe RG, Dixon JM, et al. Post-operative arm morbidity and quality of life. Results of the ALMANAC randomised trial comparing sentinel node biopsy with standard axillary treatment in the management of patients with early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2006;95(3):279-93.
18. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg*. 1994;220(3):391-8; discussion 8-401.
19. Goyal A, Mansel RE. Current status of sentinel lymph node biopsy in solid malignancies. *World J Surg Oncol*. 2004;2:9.

20. Cody HS, Hill AD, Tran KN, Brennan MF, Borgen PI. Credentialing for breast lymphatic mapping: how many cases are enough? *Ann Surg.* 1999;229(5):723-6; discussion 6-8.
21. Morton DL. Sentinel node mapping and an International Sentinel Node Society: current issues and future directions. *Ann Surg Oncol.* 2004;11(3 Suppl):137S-43S.
22. Cox CE, Pendas S, Cox JM, Joseph E, Shons AR, Yeatman T, et al. Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer. *Ann Surg.* 1998;227(5):645-51; discussion 51-3.
23. Giuliano AE. Intradermal blue dye to identify sentinel lymph node in breast cancer. *Lancet.* 1997;350(9082):958.
24. Bedrosian I, Reynolds C, Mick R, Callans LS, Grant CS, Donohue JH, et al. Accuracy of sentinel lymph node biopsy in patients with large primary breast tumors. *Cancer.* 2000;88(11):2540-5.
25. Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, Yeatman T, Balducci L, Ku N, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA.* 1996;276(22):1818-22.
26. Alazraki NP, Eshima D, Eshima LA, Herda SC, Murray DR, Vansant JP, et al. Lymphoscintigraphy, the sentinel node concept, and the intraoperative gamma probe in melanoma, breast cancer, and other potential cancers. *Semin Nucl Med.* 1997;27(1):55-67.
27. Alex JC, Krag DN, Harlow SP, Meijer S, Loggie BW, Kuhn J, et al. Localization of regional lymph nodes in melanomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;124(2):135-40.
28. Cochran AJ, Balda BR, Starz H, Bachter D, Krag DN, Cruse CW, et al. The Augsburg Consensus. Techniques of lymphatic mapping, sentinel lymphadenectomy, and completion lymphadenectomy in cutaneous malignancies. *Cancer.* 2000;89(2):236-41.
29. Cox CE, Furman B, Dupont EL, Jakub JW, Stowell N, Clark J, et al. Novel techniques in sentinel lymph node mapping and localization of nonpalpable breast lesions: the Moffitt experience. *Ann Surg Oncol.* 2004;11(3 Suppl):222S-6S.
30. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Costantino JP, et al. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(10):927-33.
31. Layeequr Rahman R, Crawford SL, Siwawa P. Management of axilla in breast cancer - The saga continues. *Breast.* 2015;24(4):343-53.
32. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Ashikaga T, et al. Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer: results from the NSABP B-32 randomised phase III trial. *Lancet Oncol.* 2007;8(10):881-8.
33. Hill AD, Tran KN, Akhurst T, Yeung H, Yeh SD, Rosen PP, et al. Lessons learned from 500 cases of lymphatic mapping for breast cancer. *Ann Surg.* 1999;229(4):528-35.
34. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Galimberti V, Luini A, Zurrada S, et al. Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(4):368-73.
35. Ho A, Morrow M. The evolution of the locoregional therapy of breast cancer. *Oncologist.* 2011;16(10):1367-79.
36. Buchholz TA, Lehman CD, Harris JR, Pockaj BA, Khouri N, Hylton NF, et al. Statement of the science concerning locoregional treatments after preoperative chemotherapy for breast cancer: a National Cancer Institute conference. *J Clin Oncol.* 2008;26(5):791-7.
37. Yates L, Kirby A, Crichton S, Gillett C, Cane P, Fentiman I, et al. Risk factors for regional nodal relapse in breast cancer patients with one to three positive axillary nodes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;82(5):2093-103.
38. Langer I, Marti WR, Guller U, Moch H, Harder F, Oertli D, et al. Axillary recurrence rate in breast cancer patients with negative sentinel lymph node (SLN) or SLN micrometastases: prospective analysis of 150 patients after SLN biopsy. *Ann Surg.* 2005;241(1):152-8.

39. Barthelmes L, Goyal A, Newcombe RG, McNeill F, Mansel RE, groups NSaAs. Adverse reactions to patent blue V dye - The NEW START and ALMANAC experience. *Eur J Surg Oncol*. 2010;36(4):399-403.
40. Barth A, Craig PH, Silverstein MJ. Predictors of axillary lymph node metastases in patients with T1 breast carcinoma. *Cancer*. 1997;79(10):1918-22.
41. Rivadeneira DE, Simmons RM, Christos PJ, Hanna K, Daly JM, Osborne MP. Predictive factors associated with axillary lymph node metastases in T1a and T1b breast carcinomas: analysis in more than 900 patients. *J Am Coll Surg*. 2000;191(1):1-6; discussion -8.
42. Greco M, Agresti R, Cascinelli N, Casalini P, Giovanazzi R, Maucione A, et al. Breast cancer patients treated without axillary surgery: clinical implications and biologic analysis. *Ann Surg*. 2000;232(1):1-7.
43. Martelli G, Boracchi P, De Palo M, Pilotti S, Oriana S, Zucali R, et al. A randomized trial comparing axillary dissection to no axillary dissection in older patients with T1N0 breast cancer: results after 5 years of follow-up. *Ann Surg*. 2005;242(1):1-6; discussion 7-9.
44. Rudenstam CM, Zahrieh D, Forbes JF, Crivellari D, Holmberg SB, Rey P, et al. Randomized trial comparing axillary clearance versus no axillary clearance in older patients with breast cancer: first results of International Breast Cancer Study Group Trial 10-93. *J Clin Oncol*. 2006;24(3):337-44.
45. Hoebbers FJ, Borger JH, Hart AA, Peterse JL, Th EJ, Lebesque JV. Primary axillary radiotherapy as axillary treatment in breast-conserving therapy for patients with breast carcinoma and clinically negative axillary lymph nodes. *Cancer*. 2000;88(7):1633-42.
46. Martelli G, Miceli R, Costa A, Coradini D, Zurrida S, Piromalli D, et al. Elderly breast cancer patients treated by conservative surgery alone plus adjuvant tamoxifen: fifteen-year results of a prospective study. *Cancer*. 2008;112(3):481-8.
47. Hughes KS, Schnaper LA, Berry D, Cirincione C, McCormick B, Shank B, et al. Lumpectomy plus tamoxifen with or without irradiation in women 70 years of age or older with early breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(10):971-7.
48. Louis-Sylvestre C, Clough K, Asselain B, Vilcoq JR, Salmon RJ, Campana F, et al. Axillary treatment in conservative management of operable breast cancer: dissection or radiotherapy? Results of a randomized study with 15 years of follow-up. *J Clin Oncol*. 2004;22(1):97-101.
49. Veronesi U, Orecchia R, Zurrida S, Galimberti V, Luini A, Veronesi P, et al. Avoiding axillary dissection in breast cancer surgery: a randomized trial to assess the role of axillary radiotherapy. *Ann Oncol*. 2005;16(3):383-8.
50. Johansen H, Kaae S, Jensen MB, Mouridsen HT. Extended radical mastectomy versus simple mastectomy followed by radiotherapy in primary breast cancer. A fifty-year follow-up to the Copenhagen Breast Cancer randomised study. *Acta Oncol*. 2008;47(4):633-8.
51. Johansen H, Kaae S, Schiødt T. Simple mastectomy with postoperative irradiation versus extended radical mastectomy in breast cancer. A twenty-five-year follow-up of a randomized trial. *Acta Oncol*. 1990;29(6):709-15.
52. Gill G, Centre STGoTRACoSraNCT. Sentinel-lymph-node-based management or routine axillary clearance? One-year outcomes of sentinel node biopsy versus axillary clearance (SNAC): a randomized controlled surgical trial. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(2):266-75.
53. Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, Goyal A, Newcombe RG, Dixon JM, et al. Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(9):599-609.
54. Veronesi U, Viale G, Paganelli G, Zurrida S, Luini A, Galimberti V, et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: ten-year results of a randomized controlled study. *Ann Surg*. 2010;251(4):595-600.
55. Gill PG. Sentinel lymph node biopsy versus axillary clearance in operable breast cancer: The RACS SNAC trial, a multicenter randomized trial of the Royal Australian College of Surgeons (RACS) Section of Breast Surgery, in collaboration with the National Health and Medical Research Council Clinical Trials Center. *Ann Surg Oncol*. 2004;11(3 Suppl):216S-21S.

56. Wang Z, Wu LC, Chen JQ. Sentinel lymph node biopsy compared with axillary lymph node dissection in early breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;129(3):675-89.
57. Zavagno G, De Salvo GL, Scalco G, Bozza F, Barutta L, Del Bianco P, et al. A Randomized clinical trial on sentinel lymph node biopsy versus axillary lymph node dissection in breast cancer: results of the Sentinella/GIVOM trial. *Ann Surg.* 2008;247(2):207-13.
58. Canavese G, Catturich A, Vecchio C, Tomei D, Gipponi M, Villa G, et al. Sentinel node biopsy compared with complete axillary dissection for staging early breast cancer with clinically negative lymph nodes: results of randomized trial. *Ann Oncol.* 2009;20(6):1001-7.
59. Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, Whitworth PW, Blumencranz P, Leitch AM, et al. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. *Ann Surg.* 2010;252(3):426-32; discussion 32-3.
60. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, Viale G, Luini A, Veronesi P, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(4):297-305.
61. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2011;305(6):569-75.
62. Straver ME, Meijnen P, van Tienhoven G, van de Velde CJ, Mansel RE, Bogaerts J, et al. Sentinel node identification rate and nodal involvement in the EORTC 10981-22023 AMAROS trial. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(7):1854-61.
63. Giuliano AE, Ballman K, McCall L, Beitsch P, Whitworth PW, Blumencranz P, et al. Locoregional Recurrence After Sentinel Lymph Node Dissection With or Without Axillary Dissection in Patients With Sentinel Lymph Node Metastases: Long-term Follow-up From the American College of Surgeons Oncology Group (Alliance) ACOSOG Z0011 Randomized Trial. *Ann Surg.* 2016;264(3):413-20.
64. Solá M, Alberro JA, Fraile M, Santesteban P, Ramos M, Fabregas R, et al. Complete axillary lymph node dissection versus clinical follow-up in breast cancer patients with sentinel node micrometastasis: final results from the multicenter clinical trial AATRM 048/13/2000. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(1):120-7.
65. Donker M, van Tienhoven G, Straver ME, Meijnen P, van de Velde CJ, Mansel RE, et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):1303-10.
66. Lucci A, McCall LM, Beitsch PD, Whitworth PW, Reintgen DS, Blumencranz PW, et al. Surgical complications associated with sentinel lymph node dissection (SLND) plus axillary lymph node dissection compared with SLND alone in the American College of Surgeons Oncology Group Trial Z0011. *J Clin Oncol.* 2007;25(24):3657-63.
67. Sundar SS, Ganesan TS. Role of lymphangiogenesis in cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(27):4298-307.
68. Witte MH, Bernas MJ, Martin CP, Witte CL. Lymphangiogenesis and lymphangiodysplasia: from molecular to clinical lymphology. *Microsc Res Tech.* 2001;55(2):122-45.
69. Alitalo A, Detmar M. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. *Oncogene.* 2012;31(42):4499-508.
70. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J.* 2002;21(7):1505-13.
71. Halper J. Growth factors as active participants in carcinogenesis: a perspective. *Vet Pathol.* 2010;47(1):77-97.





72. Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J.* 2001;20(17):4762-73.
73. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature.* 2005;438(7070):946-53.
74. Achen MG, Mann GB, Stacker SA. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *Br J Cancer.* 2006;94(10):1355-60.
75. Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, Paavonen K, Alitalo K, Detmar M. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood.* 2007;109(3):1010-7.
76. He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Yla-Herttuala S, et al. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res.* 2005;65(11):4739-46.
77. Mohammed RA, Green A, El-Shikh S, Paish EC, Ellis IO, Martin SG. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer.* 2007;96(7):1092-100.
78. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Tsukiyama A, Imabun S, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C in breast carcinoma with long-term follow-up. *Mod Pathol.* 2003;16(4):309-14.
79. Ran S, Volk L, Hall K, Flister MJ. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology.* 2010;17(4):229-51.
80. Lauria R, Perrone F, Carlomagno C, De Laurentiis M, Morabito A, Gallo C, et al. The prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in operable breast cancer. *Cancer.* 1995;76(10):1772-8.
81. Liang B, Li Y. Prognostic Significance of VEGF-C Expression in Patients with Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Iran J Public Health.* 2014;43(2):128-35.
82. Shibata MA, Morimoto J, Shibata E, Otsuki Y. Combination therapy with short interfering RNA vectors against VEGF-C and VEGF-A suppresses lymph node and lung metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer model. *Cancer Gene Ther.* 2008;15(12):776-86.
83. Thiele W, Sleeman JP. Tumor-induced lymphangiogenesis: a target for cancer therapy? *J Biotechnol.* 2006;124(1):224-41.
84. Mohammed RA, Ellis IO, Elsheikh S, Paish EC, Martin SG. Lymphatic and angiogenic characteristics in breast cancer: morphometric analysis and prognostic implications. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;113(2):261-73.
85. Van der Auwera I, Van den Eynden GG, Colpaert CG, Van Laere SJ, van Dam P, Van Marck EA, et al. Tumor lymphangiogenesis in inflammatory breast carcinoma: a histomorphometric study. *Clin Cancer Res.* 2005;11(21):7637-42.
86. Van den Eynden GG, Vandenbergh MK, van Dam PJ, Colpaert CG, van Dam P, Dirix LY, et al. Increased sentinel lymph node lymphangiogenesis is associated with nonsentinel axillary lymph node involvement in breast cancer patients with a positive sentinel node. *Clin Cancer Res.* 2007;13(18 Pt 1):5391-7.
87. McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 1992;326(26):1756-61.
88. Liersch R, Hirakawa S, Berdel WE, Mesters RM, Detmar M. Induced lymphatic sinus hyperplasia in sentinel lymph nodes by VEGF-C as the earliest premetastatic indicator. *Int J Oncol.* 2012;41(6):2073-8.
89. Kinoshita J, Kitamura K, Kabashima A, Saeki H, Tanaka S, Sugimachi K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;66(2):159-64.



90. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, et al. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;91(2):125-32.
91. Qian CN, Berghuis B, Tsarfaty G, Bruch M, Kort EJ, Ditlev J, et al. Preparing the "soil": the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66(21):10365-76.
92. Koyama Y, Kaneko K, Akazawa K, Kanbayashi C, Kanda T, Hatakeyama K. Vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor-d messenger RNA expression in breast cancer: association with lymph node metastasis. *Clin Breast Cancer.* 2003;4(5):354-60.
93. Hoar FJ, Chaudhri S, Wadley MS, Stonelake PS. Co-expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and c-erbB2 in human breast carcinoma. *Eur J Cancer.* 2003;39(12):1698-703.
94. Gisterek I, Matkowski R, Koźlak J, Duś D, Lacko A, Szelachowska J, et al. Evaluation of prognostic value of VEGF-C and VEGF-D in breast cancer--10 years follow-up analysis. *Anticancer Res.* 2007;27(4C):2797-802.
95. Li YS, Kaneko M, Amatya VJ, Takeshima Y, Arihiro K, Inai K. Expression of vascular endothelial growth factor-C and its receptor in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Pathol Int.* 2006;56(5):256-61.
96. Zhang XH, Huang DP, Guo GL, Chen GR, Zhang HX, Wan L, et al. Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer. *BMC Cancer.* 2008;8:4.
97. Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol.* 2005;18(1):143-52.
98. Zhao YC, Ni XJ, Wang MH, Zha XM, Zhao Y, Wang S. Tumor-derived VEGF-C, but not VEGF-D, promotes sentinel lymph node lymphangiogenesis prior to metastasis in breast cancer patients. *Med Oncol.* 2012;29(4):2594-600.
99. Granato AM, Nanni O, Falcini F, Folli S, Mosconi G, De Paola F, et al. Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients and healthy women: useful as diagnostic tools? *Breast Cancer Res.* 2004;6(1):R38-45.
100. Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res.* 2000;60(11):2898-905.
101. Rocca A, Cancellio G, Bagnardi V, Sandri MT, Torrisi R, Zorzino L, et al. Perioperative serum VEGF and extracellular domains of EGFR and HER2 in early breast cancer. *Anticancer Res.* 2009;29(12):5111-9.
102. Byrne GJ, McDowell G, Agarawal R, Sinha G, Kumar S, Bundred NJ. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Anticancer Res.* 2007;27(5B):3481-7.
103. Möhle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(2):663-8.
104. Verheul HM, Hoekman K, Luykx-de Bakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ, et al. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res.* 1997;3(12 Pt 1):2187-90.
105. Reeves KW, Ness RB, Stone RA, Weissfeld JL, Vogel VG, Powers RW, et al. Vascular endothelial growth factor and breast cancer risk. *Cancer Causes Control.* 2009;20(3):375-86.
106. Stathopoulos J, Armakolas A, Stathopoulos GP, Gomatos IP. Plasma VEGF levels in breast cancer patients with and without metastases. *Oncol Lett.* 2010;1(4):739-41.
107. Quaranta M, Daniele A, Coviello M, Venneri MT, Abbate I, Caringella ME, et al. MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer. *Anticancer Res.* 2007;27(5B):3593-600.

108. Hodorowicz-Zaniewska D, Kibil W, Małek A, Szpor J, Kulig J, Sztefko K. Evaluation of serum concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer patients. *Pol J Pathol*. 2012;63(4):255-60.
109. Zhang SJ, Hu Y, Qian HL, Jiao SC, Liu ZF, Tao HT, et al. Expression and significance of ER, PR, VEGF, CA15-3, CA125 and CEA in judging the prognosis of breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(6):3937-40.
110. Falk RT, Staff AC, Bradwin G, Karumanchi SA, Troisi R. A prospective study of angiogenic markers and postmenopausal breast cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. *Cancer Causes Control*. 2016;27(8):1009-17.
111. Addison CL, Pond GR, Cochrane B, Zhao H, Chia SK, Levine MN, et al. Correlation of baseline biomarkers with clinical outcomes and response to fulvestrant with vandetanib or placebo in patients with bone predominant metastatic breast cancer: An OCOG ZAMBONEY sub-study. *J Bone Oncol*. 2015;4(2):47-53.
112. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471-4.
113. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007;13(16):4807-16.
114. Rosen PP. Tumor emboli in intramammary lymphatics in breast carcinoma: pathologic criteria for diagnosis and clinical significance. *Pathol Annu*. 1983;18 Pt 2:215-32.
115. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*. 2015;5(10):2929-43.
116. Pérez D, Rohde A, Callejón G, Pérez-Ruiz E, Rodrigo I, Rivas-Ruiz F, et al. Correlation between serum levels of vascular endothelial growth factor-C and sentinel lymph node status in early breast cancer. *Tumour Biol*. 2015;36(12):9285-93.
117. Heer K, Kumar H, Read JR, Fox JN, Monson JR, Kerin MJ. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer: its relation with cancer type and estrogen receptor status. *Clin Cancer Res*. 2001;7(11):3491-4.
118. McCready DR, Yong WS, Ng AK, Miller N, Done S, Youngson B. Influence of the new AJCC breast cancer staging system on sentinel lymph node positivity and false-negative rates. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(11):873-5.
119. Dauphine CE, Haukoos JS, Vargas MP, Isaac NM, Khalkhali I, Vargas HI. Evaluation of three scoring systems predicting non sentinel node metastasis in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(3):1014-9.
120. Viale G, Bosari S, Mazzarol G, Galimberti V, Luini A, Veronesi P, et al. Intraoperative examination of axillary sentinel lymph nodes in breast carcinoma patients. *Cancer*. 1999;85(11):2433-8.
121. Al-Mowallad A, Kirwan C, Byrne G, McDowell G, Li C, Stewart A, et al. Vascular endothelial growth factor-C in patients with breast cancer. *In Vivo*. 2007;21(3):549-51.
122. Gisterek I, Matkowski R, Lacko A, Sedlaczek P, Szewczyk K, Biecek P, et al. Serum vascular endothelial growth factors a, C and d in human breast tumors. *Pathol Oncol Res*. 2010;16(3):337-44.
123. Tamura M, Oda M, Tsunozuka Y, Matsumoto I, Kawakami K, Ohta Y, et al. Chest CT and serum vascular endothelial growth factor-C level to diagnose lymph node metastasis in patients with primary non-small cell lung cancer. *Chest*. 2004;126(2):342-6.
124. Morgillo F, De Vita F, Antonioli G, Orditura M, Auriemma PP, Diadema MR, et al. Serum insulin-like growth factor 1 correlates with the risk of nodal metastasis in endocrine-positive breast cancer. *Curr Oncol*. 2013;20(4):e283-8.
125. Thielemann A, Baszczuk A, Kopczyński Z, Kopczyński P, Grodecka-Gazdecka S. Clinical usefulness of assessing VEGF and soluble receptors sVEGFR-1 and sVEGFR-2 in women with breast cancer. *Ann Agric Environ Med*. 2013;20(2):293-7.



126. Tamura M, Ohta Y. Serum vascular endothelial growth factor-C level in patients with primary nonsmall cell lung carcinoma: a possible diagnostic tool for lymph node metastasis. *Cancer*. 2003;98(6):1217-22.
127. Tsirlis TD, Papastratis G, Masselou K, Tsigris C, Papachristodoulou A, Kostakis A, et al. Circulating lymphangiogenic growth factors in gastrointestinal solid tumors, could they be of any clinical significance? *World J Gastroenterol*. 2008;14(17):2691-701.
128. Wang TB, Deng MH, Qiu WS, Dong WG. Association of serum vascular endothelial growth factor-C and lymphatic vessel density with lymph node metastasis and prognosis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2007;13(12):1794-7; discussion 7-8.
129. Al-Moundhri MS, Al-Shukaili A, Al-Nabhani M, Al-Bahrani B, Burney IA, Rizivi A, et al. Measurement of circulating levels of VEGF-A, -C, and -D and their receptors, VEGFR-1 and -2 in gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2008;14(24):3879-83.
130. Kimura H, Kato H, Tanaka N, Inose T, Faried A, Sohda M, et al. Preoperative serum vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) levels predict recurrence in patients with esophageal cancer. *Anticancer Res*. 2008;28(1A):165-9.
131. Cheng D, Liang B, Li Y. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF-C) as a diagnostic and prognostic marker in patients with ovarian cancer. *PLoS One*. 2013;8(2):e55309.
132. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Kowalczyk O, Kulikowski M, Niklinski J. Serum levels of VEGF and VEGF-C in patients with endometrial cancer. *Eur Cytokine Netw*. 2011;22(1):45-51.
133. Zhang Y, Meng X, Zeng H, Guan Y, Zhang Q, Guo S, et al. Serum vascular endothelial growth factor-C levels: A possible diagnostic marker for lymph node metastasis in patients with primary non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2013;6(2):545-9.
134. Sun R, Wang X, Li X. Correlation Analysis of Nasopharyngeal Carcinoma TNM Staging with Serum EA IgA and VCA IgA in EBV and VEGF-C and -D. *Med Sci Monit*. 2015;21:2105-9.
135. Benoit T, Keller EX, Wolfsgruber P, Hermanns T, Günthart M, Banzola I, et al. High VEGF-D and Low MMP-2 Serum Levels Predict Nodal-Positive Disease in Invasive Bladder Cancer. *Med Sci Monit*. 2015;21:2266-74.
136. Rueda A, Olmos D, Vicioso L, Quero C, Gallego E, Pajares-Hachero BI, et al. Role of vascular endothelial growth factor C in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(5):1286-94.
137. Liu Y, Tamimi RM, Collins LC, Schnitt SJ, Gilmore HL, Connolly JL, et al. The association between vascular endothelial growth factor expression in invasive breast cancer and survival varies with intrinsic subtypes and use of adjuvant systemic therapy: results from the Nurses' Health Study. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;129(1):175-84.
138. Redondo M, Funez R, Medina-Cano F, Rodrigo I, Acebal M, Tellez T, et al. Detection methods predict differences in biology and survival in breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2012;12:604.